

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ABORDAGENS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DA RAIVA - INQUÉRITO  
SOROLÓGICO EM ANIMAIS SILVESTRES E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO**

**Autor: Aline Alves Scarpellini Campos**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias na área de virologia**

**Orientador: Ana Cláudia Franco**

**Coorientador: Helena Beatriz de  
Carvalho Ruthner Batista**

**Porto Alegre**

**2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ABORDAGENS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DA RAIVA - INQUÉRITO  
SOROLÓGICO EM ANIMAIS SILVESTRES E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO**

**ALINE ALVES SCARPELLINI CAMPOS**

**Porto Alegre**

**2022**

**ALINE ALVES SCARPELLINI CAMPOS**

**ABORDAGENS NA PREVENÇÃO DA RAIVA - INQUÉRITO SOROLÓGICO EM ANIMAIS SILVESTRES E SEQUENCIAMENTO GENÔMICO**

Aprovada em 18 FEV 2022

APROVADO POR:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cláudia Franco  
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Julio André Benavides Tala  
Membro da comissão avaliadora

Dr. Dennis Maletich Junqueira  
Membro da comissão avaliadora

Dr. Matheus Nuner Weber  
Membro da comissão avaliadora

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

Campos, Aline Alves Scarpellini  
ABORDAGENS NA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DA RAIVA -  
INQUÉRITO SOROLÓGICO EM ANIMAIS SILVESTRES E  
SEQUENCIAMENTO GENÔMICO / Aline Alves Scarpellini  
Campos. -- 2022.  
84 f.  
Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Coorientador: Helena Beatriz de Carvalho Ruthner  
Batista.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. Anticorpos antirrábicos. 2. Vigilância genômica.  
3. Atendimento antirrábico. 4. Rabies Lyssavirus. 5.  
Morcegos. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II.  
Batista, Helena Beatriz de Carvalho Ruthner, coorient.  
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## RESUMO

As ações de vigilância e controle da raiva no Brasil, e no Rio Grande do Sul, permanecem as mesmas há décadas. As diretrizes programáticas que orientam as ações dos órgãos públicos, e que são ensinadas e repassadas aos profissionais de saúde, foram instituídas quando o predomínio dos casos de raiva humana era relacionado à raiva canina. Este modelo foi exitoso e levou ao declínio acentuado dos casos de raiva humana no Brasil e nas Américas. Porém, desde o início dos anos 2000, predomina no Brasil a raiva humana relacionada a animais silvestres, principalmente a morcegos, o que demanda reavaliar as abordagens de vigilância e a propor ações que contemplem o ciclo silvestre da raiva. Paralelo à mudança do perfil epidemiológico, novas metodologias passaram a ser utilizadas na vigilância, caso da vigilância genômica, e outras se tornaram rotina, caso das técnicas moleculares no diagnóstico. No presente estudo novas abordagens de vigilância são discutidas, ao mesmo tempo que se avalia a qualidade da profilaxia antirrábica prestada no Rio Grande do Sul e o conhecimento dos profissionais sobre as condutas preconizadas. O uso da abordagem de pesquisa de anticorpos antirrábicos em espécies de animais silvestres de maior prevalência nos atendimentos antirrábicos, permitiu identificar que primatas e canídeos silvestres são expostos ao vírus rábico no RS, apesar de não haver casos diagnosticados nestas espécies no estado. A análise da profilaxia antirrábica do estado demonstrou que houveram avanços nas condutas prescritas pelos profissionais de saúde, mas ainda são necessárias ações para que se aperfeiçoe o entendimento do novo padrão epidemiológico da raiva, com especial atenção ao ciclo silvestre, e para que se faça o uso racional de imunobiológicos. Adicionalmente, informações relevantes ao entendimento da dinâmica do vírus da raiva estão sendo obtidas através da análise molecular de genomas de amostras positivas do estado, gerando conhecimento que auxiliará na compreensão sobre a disseminação e a manutenção do RABV no estado, e no direcionamento dos esforços de controle.

**Palavras-chave:** Anticorpos antirrábicos. Vigilância Genômica. Atendimento antirrábico. *Rabies lyssavirus*.

## **ABSTRACT**

*Rabies surveillance and control actions in Brazil, and in Rio Grande do Sul, have remained the same for decades. The Rabies Control program guidelines that drive the actions of public agencies, and that are taught to and used by health professionals, were created when most cases of human rabies were related to canine rabies. This model was successful and led to a sharp decline in human rabies cases in Brazil and the Americas. However, since the beginning of the 2000s, human rabies related to wild animals, especially bats, has predominated in Brazil, which requires reassessing surveillance approaches and proposing actions that address the sylvatic cycle of rabies. Consecutively to the change in the epidemiological profile, new methodologies were incorporated in surveillance, such as genomic surveillance, and others became routine, such as molecular diagnostic techniques. In the present study, new surveillance approaches are discussed, and the quality of rabies prophylaxis provided in Rio Grande do Sul is assessed, as well as the professionals' knowledge about the recommended protocols for different potential rabies exposure. The use of the anti-rabies antibody serological surveillance approach in wild animal species with the highest prevalence in anti-rabies care allowed the understanding that wild primates and canids are exposed to the rabies virus in RS, although there are no cases diagnosed in these species in the State. The analysis of rabies prophylaxis in the State demonstrated that there were advances in the prescription recommended by health professionals, but it is still important to improve the understanding of the new epidemiological profile of rabies, with special attention to the sylvatic cycle, and for the rational use of immunobiological. Additionally, relevant information to fill some gaps about the dynamics of the rabies virus is being obtained through molecular analysis of genomes obtained from positive samples in our State, generating knowledge that will help in understanding the dissemination and maintenance of the RABV in the state, and in directing efforts to control.*

**Keywords:** *Rabies Virus Neutralizing Antibody. Genomic Surveillance. Rabies Prophylaxis. Rabies Lyssavirus.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do vírion do RABV.....	13
Figura 2 -	Representação esquemática do genoma dos <i>lyssavirus</i> .....	14
Figura 3 -	Filogenia dos lissavírus.....	16
Figura 4 -	Localização de focos de raiva herbívora, 2019, RS.....	18
Figura 5 -	Casos de Raiva Humana (RH) por espécie animal agressora no período de 2010 a 2020.....	21
Figuras 6.1 e 6.2 -	Ficha de Atendimento Antirrábico Humano, frente e verso	29
Figura 7 -	Incidência de AARH por regional de atendimento, 2015 a 2019, RS..	48
Figura 8 -	Oficina na 5ª CRS - Caxias do Sul, em 22/08/2019.....	51
Figura 9 -	Mapa com municípios de coleta e quantidade de amostras analisadas por município.....	57
Figura 10 -	Filogenia por máxima verossimilhança (ML) de 76 sequências completas do gene N.....	68
Figura 11 -	Filogenia por máxima verossimilhança (ML) de 79 sequências completas e parciais dos genes G e L.....	69
Figura 12	Filogenia por máxima verossimilhança (ML) de 127 sequências parciais e completas do gene N.....	70

### GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Número de atendimentos Antirrábicos Humanos por ano, 2007 a 2018, RS.....	31
Gráfico 2 -	NºAARH por ano, 2015 a 2019, RS.....	45
Gráfico 3 -	NºAARH por escolaridade, 2015 a 2019, RS.....	47
Gráfico 4 -	Distribuição de casos de AARH por mês de notificação, 2015 a 2019, RS.....	47

Gráfico 5 -	Número absoluto e incidência acumulada de AARH (100.000 hab.) por regional de saúde, 2015 a 2019, RS.....	49
-------------	---	----

## **QUADROS**

Quadro 1 -	Raiva em cães e gatos, 2001 a 2020, RS.....	18
Quadro 2 -	Painel de anticorpos monoclonais do CDC: padrão de reações para caracterização das variantes antigênicas encontradas na América Latina.....	25
Quadro 3 -	Padrão de reações de variantes antigênicas “não compatíveis” encontradas em silvestres do Brasil.....	26
Quadro 4 -	Prevalência do Atendimento Antirrábico humano, 2015 a 2019, RS....	46
Quadro 5 -	Espécie animal envolvida por ano, 2015 a 2019, RS.....	50
Quadro 6 -	Amostras analisadas: espécies de morcegos coletados e origem geográfica das amostras.....	58
Quadro 7 -	Dados dos sequenciamentos: dados das 17 amostras trabalhadas.....	64
Quadro 8 -	Análise automatizada gene N em 09 amostras.....	65
Quadro 9 -	Análise automatizada genes G e L em 12 amostras.....	65
Quadro 10 -	Matriz de distância da identidade nucleotídica em amostras que obtiveram 100% de cobertura do gene N, em estilo de números e mapa de calor.....	66
Quadro 11 -	Matriz de distância da identidade de aminoácidos em amostras que obtiveram 100% de cobertura do gene N, em estilo de números e mapa de calor.....	66
Quadro 12 -	Matriz de distância da identidade de nucleotídeos nos genes G e L, em estilo de números e mapa de calor.....	67
Quadro 13 -	Matriz de distância da identidade de aminoácidos nos genes G e L, em estilo de números e mapa de calor.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>(aa)</b>	Aminoácidos
<b>(AARH)</b>	Atendimento Antirrábico Humano
<b>(AcMs)</b>	Anticorpos Monoclonais
<b>(AgV)</b>	Variante antigênica
<b>(CEVS)</b>	Centro Estadual de Vigilância em Saúde
<b>(CRS)</b>	Coordenadoria Regional de Saúde
<b>(IFD)</b>	Imunofluorescência Direta
<b>(IPVDF)</b>	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
<b>(PB)</b>	Prova Biológica
<b>(PECPR)</b>	Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva
<b>(PPE)</b>	Profilaxia Pós Exposição
<b>(PPrE)</b>	Profilaxia Pré Exposição
<b>(RABV)</b>	Vírus da Raiva
<b>(RdRp)</b>	RNA polimerase RNA dependente
<b>(RH)</b>	Raiva Humana
<b>(RNA)</b>	Ácido ribonucleico
<b>(RNP)</b>	Ribonucleoproteína
<b>(RFFIT)</b>	Inibição Rápida do Foco Fluorescente
<b>(SEAPDR)</b>	Secretaria Estadual Agricultura Pecuária Desenvolvimento Rural
<b>(SINAN)</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>(SNC)</b>	Sistema Nervoso Central
<b>(SUS)</b>	Sistema Único de Saúde
<b>(WHO)</b>	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>ABSTRACT</b>	<b>16</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>17</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>19</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 O Vírus da Raiva e a diversidade dos lissavírus	12
1.2 Situação epidemiológica da Raiva no Rio Grande do Sul e manutenção do RABV no ciclo silvestre	18
1.3 Vigilância à Raiva	21
1.4 O diagnóstico da raiva na vigilância	24
1.5 Atendimento antirrábico humano	29
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
<b>3 CAPÍTULO I - INQUÉRITO SOROLÓGICO</b>	<b>35</b>
3.1 Problema de pesquisa	35
3.2 Hipóteses	36
3.3 Objetivos específicos deste capítulo	36
3.4 Metodologia	36
3.5 Artigo científico	37
<b>4 CAPÍTULO II - ANÁLISE E QUALIFICAÇÃO DO AARH NO RS</b>	<b>37</b>
4.1 Problema de pesquisa	37
4.2 Objetivos específicos deste capítulo	37
4.3 Metodologia	38
4.3.1 Tipo de estudo	38
4.3.2 Período do estudo	38
4.3.3 Local do estudo	38
4.3.4 População do estudo	38
4.3.5 Fonte e coleta de dados	38
4.3.6 Processamento e análise dos dados	39
4.3.7 Divulgação aos profissionais de saúde	39

4.4 Resultados	39
4.4.1 Qualidade dos dados	40
4.4.2 Perfil epidemiológico	41
4.4.3 Dados complementares dos AARH	44
4.4.4 Divulgação dos dados e qualificação dos profissionais de saúde	45
4.5 Discussão	46
<b>5 CAPÍTULO III - VIGILÂNCIA GENÔMICA</b>	<b>50</b>
5.1 Problema de pesquisa	50
5.2 Objetivos específicos deste capítulo	51
5.3 Hipóteses	51
5.4 Metodologia	51
5.4.1 Amostras	51
5.4.2 Diagnóstico da Raiva	53
5.4.3 Amplificação e sequenciamento	53
5.4.4 Análise Filogenética	55
5.5 Resultados	56
5.6 Discussão	66
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa negligenciada, uma zoonose viral caracterizada por uma encefalite aguda e, invariavelmente, fatal. É descrita como a doença de maior letalidade para mamíferos, incluindo humanos, dentre as doenças infecciosas conhecidas (RUPPRECHT; SALAHUDDIN, 2019). O quadro clínico descrito como raiva pode ser causado por qualquer um dos 17 vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus* (WALKER *et al.*, 2018). No entanto, mundialmente, o vírus da raiva (*Rabies Lyssavirus*) associado a cães é considerado o principal causador da doença e é responsável por cerca de 59.000 mortes humanas anualmente, particularmente na África, Ásia e Índia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Os morcegos são reconhecidamente os principais hospedeiros dos líssavirus (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Por milhares de anos as diferentes espécies de líssavirus vem co-evoluindo nos quirópteros, mas somente o vírus da raiva (RABV), através de eventos de troca de hospedeiros (*spillover*), estabeleceu um ciclo perpétuo em carnívoros terrestres (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017). Até o momento, o RABV é o único lyssavirus que ocorre no continente americano. Através de linhagens genéticas diferenciadas e bem adaptadas, o vírus da raiva vem circulando em morcegos e carnívoros terrestres, através do continente americano, em ciclos sustentados e estabelecidos, ampliando seus limites geográficos e a gama de hospedeiros.

Na América Latina, em especial no Brasil, a disponibilização da profilaxia da raiva humana e as ações de vigilância e controle da raiva canina, reduziram em mais de 99% os casos associados a cães (BENAVIDES *et al.*, 2019; FREIRE DE CARVALHO *et al.*, 2018). Porém, nas últimas décadas, o predomínio de casos relacionados a morcegos e outros animais silvestres, em detrimento dos casos pelas variantes associadas a cães domésticos, consolidou a mudança no perfil epidemiológico da raiva. Ainda assim, a maior parte das ações executadas pelos órgãos de saúde no Brasil (atendimentos antirrábicos e as ações de vigilância e controle) são direcionadas aos acidentes com cães. Assim, as ações direcionadas para o ciclo silvestre ficam limitadas ao controle das populações de morcegos hematófagos, promovidas para conter a raiva dos herbívoros.

Motivado pelo baixo conhecimento sobre as espécies que representariam hoje maior risco para a raiva humana no estado e pela ausência de dados da dinâmica do vírus em seus principais hospedeiros - os morcegos, o presente trabalho objetivou propor e avaliar diferentes abordagens que podem ser empregadas na vigilância do RABV e que geram informações que repercutem nas diretrizes da vigilância e da profilaxia da raiva. Adicionalmente, foi realizada uma análise do atendimento antirrábico dispensado no Rio Grande do Sul, sob a ótica do conhecimento atual dos profissionais de saúde, para avaliar as condutas prescritas e vivenciar a percepção destes profissionais quanto ao risco da raiva humana, principalmente em acidentes com animais silvestres.

## 1.1 O Vírus da Raiva e a diversidade dos lissavírus

O vírus da raiva (RABV) é um vírus RNA, de fita simples, não segmentado de polaridade negativa, protótipo do gênero *Lyssavirus*, pertencente à família *Rhabdoviridae*. Acredita-se que todos os mamíferos sejam suscetíveis à infecção por lyssavirus, incluindo o homem. O resultado da infecção é uma encefalite característica, aguda, progressiva e fatal. Das 17 espécies de lissavírus, apenas o RABV têm múltiplos hospedeiros (MARSTON *et al.*, 2018). A transmissão se dá pelo contato direto com a saliva do hospedeiro contaminado através de feridas na pele (usualmente mordidas, arranhaduras) ou contato direto com as mucosas. Os morcegos são considerados os principais hospedeiros do gênero, mas a lista de espécies hospedeiras e de novas linhagens genéticas vem aumentando ao longo dos anos (CORDEIRO *et al.*, 2016; MARSTON *et al.*, 2018; MESKE *et al.*, 2021).

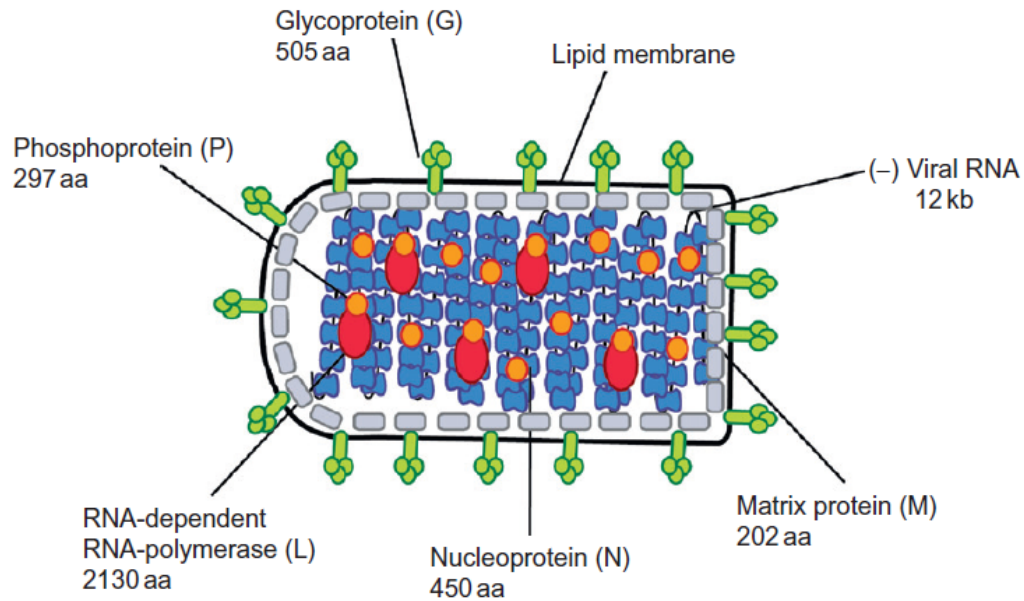
Os vírions do RABV são envelopados e se caracterizam pelo seu formato de bala de revólver, com uma extremidade cônica e outra plana, com tamanho aproximado entre 100nm a 300nm de comprimento e 75nm de diâmetro, dependendo da linhagem genética. O genoma de RABV, que tem por volta de 12 kb, codifica as cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e a polimerase (L). O RNA viral é encapsidado pela nucleoproteína N, composta por 450 aminoácidos(aa), formando o nucleocapsídeo

helicoidal.

O nucleocapsídeo é associado a diversas unidades da fosfoproteína P (297aa) (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011). A razão da N para P na ribonucleoproteína do RABV é de 2 para 1 por vírion, o que indica que duas moléculas de N interagem com 1 molécula de P (WALKER et al.,2018). Algumas unidades de P carregam cópias da RNA polimerase RNA dependente (RdRp), que corresponde a proteína L (2130 aa). A associação do RNA, mais as proteínas N, P e L forma o complexo da ribonucleoproteína (RNP), que constitui a unidade de replicação ativa e que protege o RNA contra a ação de ribonucleases (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

A proteína de matriz M (202 aa) e a glicoproteína G (505aa), são proteínas de membrana. A G é uma proteína transmembrana que está associada à entrada do vírus na célula, atuando no reconhecimento do receptor e na mediação da fusão do envelope viral com a membrana celular (ALBERTINI *et al.*, 2012), o que resulta na liberação da RNP no citoplasma do hospedeiro. Além da adesão à célula hospedeira, a proteína G também está associada à indução da formação de anticorpos. A M está localizada abaixo da membrana viral, revestindo o interior do envelope viral, formando uma ponte entre a região carboxi-terminal da G e o RNP (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

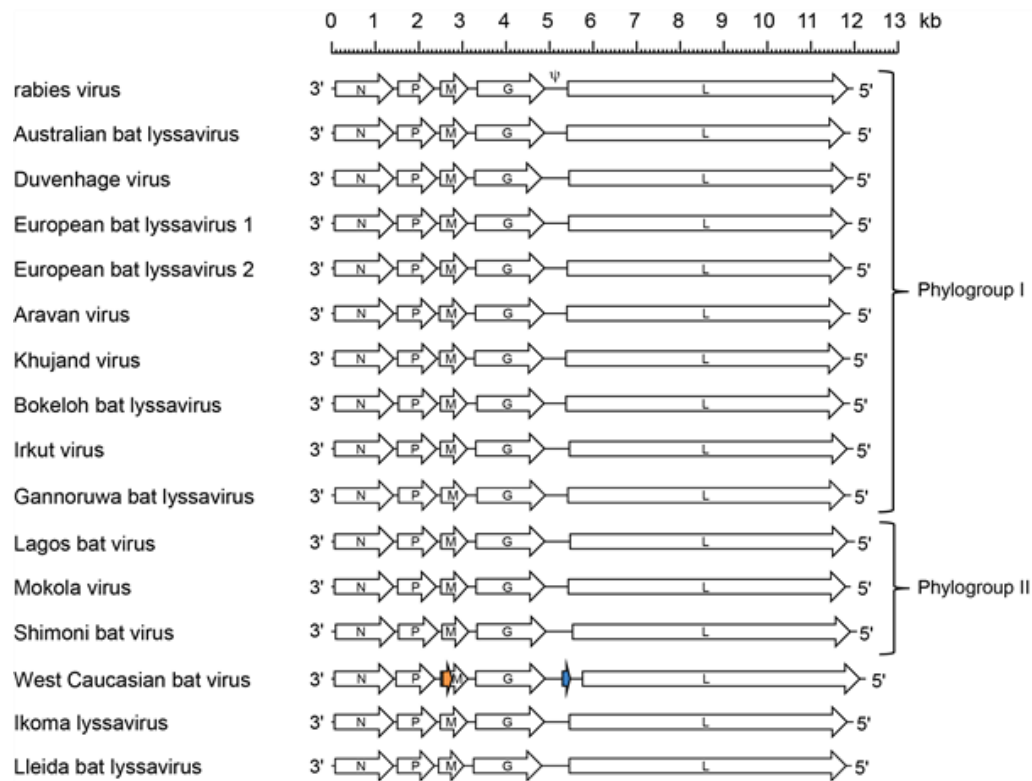
**Figura 1** - Representação esquemática do vírion do RABV. Proteínas virais (N para nucleoproteína, P para fosfoproteína, M para proteína da matriz, G para glicoproteína e L para proteína da polimerase) e seus comprimentos em aminoácidos são indicados.



Fonte: Albertini et al. (2011)

Os genes das proteínas N, M e L são bem conservados, sendo similares em estrutura e comprimento em todas as espécies de lissavírus e suas variantes (Figura 2). Os genes da G e P apresentam sequências intergênicas menos conservadas e variação em seu comprimento, sendo que no G esta variação está restrita à região (domínio) citoplasmática (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; MARSTON *et al.*, 2007).

**Figura 2** - Representação esquemática do genoma dos *lyssavirus*. N, P, M, G e L representam ORFs que codificam as proteínas estruturais. Os genomas apresentam longas regiões não traduzidas nos genes G; no vírus do morcego do Cáucaso Ocidental, esta região contém uma ORF de 180 nt (em azul turquesa) que codifica uma possível proteína de 7,1 kDa. O vírus do morcego do Cáucaso Ocidental também apresenta uma ORF alternativa de 228 nt (em laranja) que começa perto do início do gene M, codificando uma possível proteína de 8,4 kDa.



Fonte: ICTV (2020). Disponível em

[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus)

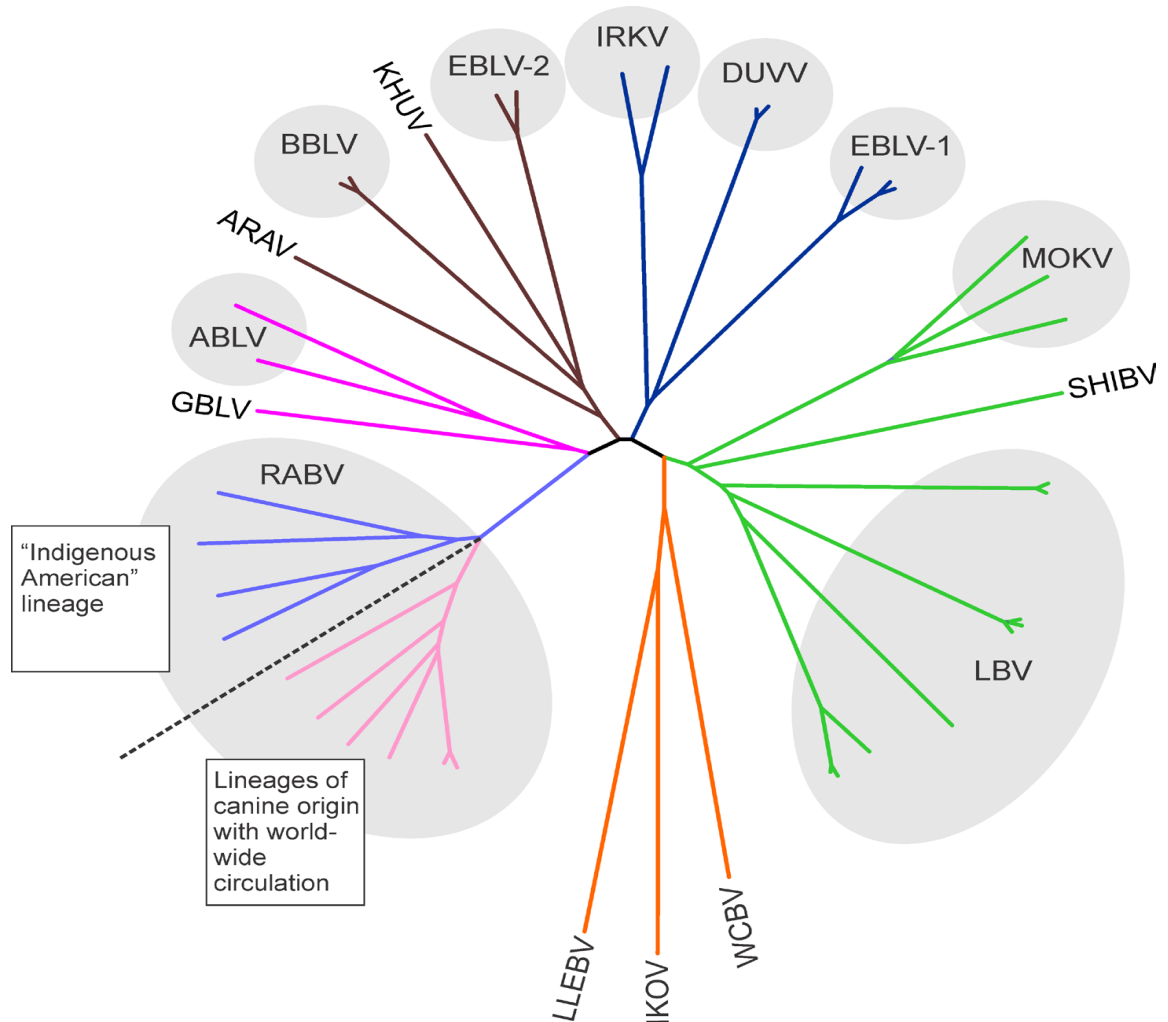
Os vírus atribuídos ao gênero *Lyssavirus* formam um grupo monofilético distinto, baseado em análises filogenéticas bem suportadas, inferidas a partir de sequências completas da nucleoproteína, denominada N (LEFKOWITZ *et al.*, 2018). Os vírus que apresentam menos que 80% de similaridade na sequência de nucleotídeos (nt) ou menos que 92% na sequência de aminoácidos (aa), pertencem a diferentes genótipos (BOURHY; KISSI; TORDO, 1993; KISSI; TORDO; BOURHY, 1995). As distâncias genéticas entre as espécies de lyssavirus são significativamente menores do que as distâncias entre vírus de diferentes espécies em outros gêneros de rhabdovírus, característica atribuída a restrições evolutivas, possivelmente impostas por sua biologia diferenciada ou suas preferências de hospedeiro. Por razões não muito claras, o vírus



da raiva é a espécie de lyssavirus mais bem sucedida em termos de prevalência e progênie viral (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

Os lissavírus são classificados em 2 filogrupos distintos, filogrupo I e filogrupo II, caracterizados a partir da reatividade sorológica cruzada contra as proteínas virais (antigenicidade), da distância genética dos ectodomínios (porção exposta na superfície da membrana do vírus) da glicoproteína G e da filogenia da nucleoproteína N. O filogrupo I compreende *Rabies lyssavirus*, *Aravan lyssavirus*, *Australian bat lyssavirus*, *Bokeloh lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *European bat lyssaviruses*, tipo 1 e tipo 2, *Irkut lyssavirus*, *Khujand lyssavirus*, e o novo *Gannoruwa bat lyssavirus*. O filogrupo II inclui *Lagos bat lyssavirus*, *Mokola lyssavirus*, e *Shimoni bat lyssavirus*. Os vírus *West Caucasian bat lyssavirus*, *Ikoma lyssavirus*, e *Lleida bat lyssavirus*, devido às suas divergências genéticas e antigênicas, não estão incluídos em nenhum dos dois filogrupos (HORTON *et al.*, 2014) (Figura 3). Quanto a identidade de sequência, os vírus classificados no filogrupo II são mais parecidos, com 71,5% de média de similaridade genética do gene da glicoproteína, já os vírus classificados no filogrupo I exibem uma média de similaridade de sequência de nucleotídeos de 70,3% (FOOKS *et al.*, 2021). Cabe destacar que alguns lissavírus são tão divergentes que os imunobiológicos disponíveis (vacinas e imunoglobulinas) não oferecem proteção cruzada entre eles (DE BENEDICTIS *et al.*, 2016; FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; KESSELS *et al.*, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

**Figura 3** - Filogenia dos lissavírus. Árvore filogenética não enraizada de lissavírus atualmente reconhecidos e putativos (método de *neighbor-joining*, matriz de distâncias-p). *Australian bat lyssavirus*, ABLV; *Aravan lyssavirus*, ARAV; *Bokeloh lyssavirus*, BBLV; *Duvenhage lyssavirus*, DUVV; *European bat lyssaviruses*, tipo 1 e tipo 2, EBLV-1, EBLV-2; *Gannoruwa bat lyssavirus*, GBLV; *Ikoma lyssavirus*, IKOV; *Irkut lyssavirus*, IRKV; *Khujand lyssavirus*, KHUV; *Lagos bat lyssavirus*, LBV; *Lleida bat lyssavirus*, LLEBV; *Mokola lyssavirus*, MOKV; *Rabies lyssavirus*, RABV; *Shimoni bat lyssavirus*, SHIBV; *West Caucasian bat lyssavirus*, WCBV.



Fonte: Rupprecht; Kuzmin; Meslin (2017)

Todos os integrantes do filogruppo I podem ser encontrados nos morcegos. Destes, somente o RABV conseguiu perpetuar sua replicação também em carnívoros. Estas mudanças de hospedeiros são cruciais, e continuam a influenciar na história evolutiva e na dispersão do RABV. Como exemplo, lissavírus de múltiplas espécies circulam em morcegos do velho mundo, menos RABV, enquanto os morcegos do novo mundo hospedam apenas o RABV. Por outro lado,

carnívoros do velho e do novo mundo são hospedeiros do RABV. O RABV, até o momento, é o único *Lyssavirus* descrito no continente americano (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

## **1.2 Situação epidemiológica da Raiva no Rio Grande do Sul e manutenção do RABV no ciclo silvestre**

Segundo critério da Organização Mundial de Saúde, um país ou região é definido como livre de raiva canina se não houver casos de raiva mediado por cão, também chamada raiva urbana, das variantes antigênicas 1 e 2 (AgV1 e AgV2), em humanos, cães ou qualquer outra espécie animal, por pelo menos 2 anos. Adicionalmente, todos casos autóctones em carnívoros devem ser confirmados, através de técnica molecular, como originados em morcegos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A partir desta definição, o estado do Rio Grande do Sul já pode ser considerado como região livre da raiva canina. No RS o último caso de raiva humana ocorreu em 1981 e o último caso de raiva canina por variante urbana se deu em 1988 (CEVS CENTRO ESTADUAL DE VIGILANCIA EM SAUDE, 2021). Todos os casos de raiva animal em carnívoros são enviados ao laboratório de referência (Instituto Pasteur, SP) para análise molecular e identificação da variante viral.

Desde o início dos anos 70 até o ano de 1995 o Rio Grande do Sul realizou campanhas massivas de vacinação canina e felina. Anos de trabalho com bom índice de cobertura vacinal aliado a outras atividades de prevenção levaram o estado ao controle da raiva urbana. Desde 1996 estão suspensas as campanhas públicas de vacinação canina, permanecendo a recomendação da vacinação individual sob responsabilidade do proprietário (DIEDRICH; PREDEBON; PRATO, 2013). A ocorrência de raiva em cães e gatos no Rio Grande do Sul é rara e caracterizada por eventos incidentais, esporádicos e associada predominantemente a variantes virais de morcegos (Quadro 1), com maior frequência da variante associada a morcegos insetívoros.

**Quadro 1 - Raiva em cães e gatos, 2001 a 2020, RS**

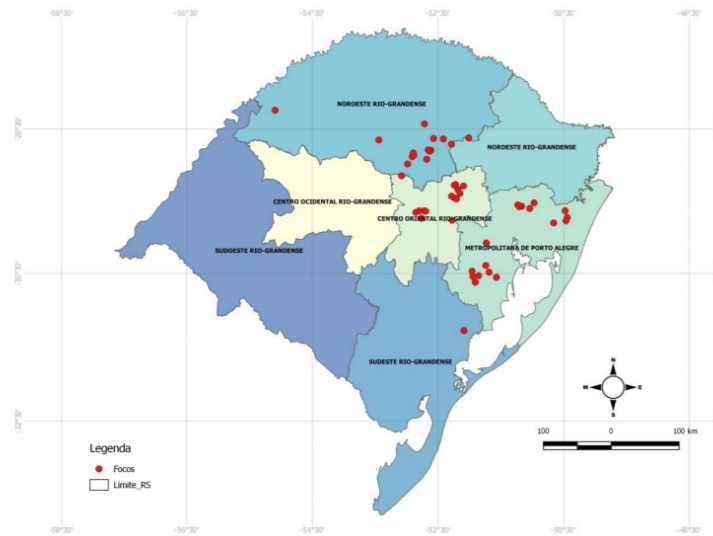
<b>ANO</b>	<b>ESPÉCIE ANIMAL</b>	<b>VARIANTE/SP</b>	<b>MUNICÍPIO</b>
2001	Gato	AgV3	São Lourenço do Sul
2007	Cão	AgV4	Tapes
2013	Gato	AgV3	Passa Sete
2014	Gato	AgV4	Capão do Leão
2015	Gato	AgV4	Rio Grande
2020	Gato	AgV4	Rolador

Fonte: CEVS/SES (2020)

**Nota:** AgV3 - Variante antigênica 3 associada a morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*; AgV4 - variante antigênica 4 associada a morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*

Já a raiva em herbívoros, oriunda de morcegos hematófagos, é considerada endêmica no Rio Grande do Sul. Anualmente dezenas de animais de produção são acometidos, incluindo bovinos, equinos, suínos e ovinos, gerando prejuízos econômicos e sociais em diferentes regiões do estado. Apesar disso, a ocorrência anual de focos em herbívoros é frequente e as perdas econômicas não desencadeiam estratégias ativas de controle (SEAPDR, 2019). Em 2018 foram confirmados focos de raiva em herbívoros em 24 municípios, em 2019 o número de municípios com focos de raiva herbívora subiu para 31 (Figura 4) (SEAPDR, 2019).

**Figura 4 – Localização de focos de raiva herbívora, 2019, RS**



Fonte: SEAPDR RS (2019)

A recorrência do RABV nas colônias locais de morcegos pode ser observada pelo diagnóstico frequente de morcegos não hematófagos positivos para raiva e pela endemicidade da raiva nos herbívoros. A forma pela qual este ciclo silvestre se perpetua no estado, e quais outras espécies silvestres podem estar envolvidas, ainda não está esclarecido (CEVS CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

O histórico evolutivo do RABV demonstra que a sua permanência no meio ambiente está relacionada à sua bem-sucedida adaptação em algumas espécies, assim como a sua ampla variedade de possíveis hospedeiros (MARSTON et al., 2018). A agressividade associada ao quadro clínico favorece a transmissão mesmo em hospedeiros com baixa densidade populacional, ou entre espécies que naturalmente mantenham pouco contato direto entre si. (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; HAMPSON et al., 2015). Outro fator associado seria um possível longo período de incubação, promovendo a dispersão entre novas populações suscetíveis. Fatores como compartilhamento de território ou abrigo, fatores climáticos e antropogênicos, além da proximidade genética entre as diferentes espécies, também influenciam na manutenção do vírus em hospedeiros variados. No caso dos morcegos, as atividades humanas modernas também contribuem para o aumento de sua densidade e distribuição, como por exemplo a criação de gado, no caso das populações de morcegos hematófagos, o desflorestamento e a construção de estruturas que favorecem o abrigo de morcegos não

hematófagos (BENAVIDES et al., 2020b, 2020a; BROCK FENTON et al., 2020; STREICKER et al., 2012). Todos esses mecanismos atuam como estratégias de manutenção do ciclo enzoótico da raiva no ambiente e, por vezes, permitem a troca de hospedeiros (spillover), dando origem a linhagens que conseguem manter ciclos de transmissão sustentados. Por exemplo, a introdução do vírus rábico de cães domésticos em populações de canídeos silvestres (*Cerdocyon thous*) deu origem a uma linhagem viral distinta, já caracterizada em um ciclo enzoótico em estados do nordeste do país. Um caso de raiva humana já foi associado a esta linhagem viral de canídeo silvestre, adquirida após agressão por Guaxinim (*Procyon cancrivorus*) (CORDEIRO et al., 2016), e a linhagem de RABV associada a saguis (*Callithrix jacchus*) já foi diagnosticada em um canídeo silvestre (*C. thous*) (FAVORETTO et al., 2006). Esses eventos de spillover, ainda não associados a um ciclo sustentado, detectados repetidamente, mas de forma esporádica, demonstram o risco e a possibilidade permanente do surgimento de novas linhagens e novas espécies de hospedeiros.

O Rio Grande do Sul apresenta grande diversidade de mamíferos, incluindo espécies das 5 diferentes famílias da ordem Carnívora que ocorrem no Brasil: *Canidae*, *Felidae*, *Mephitidae*, *Mustelidae* e *Procyonidae* (DOS REIS, 2006). Todas potenciais reservatórios para o RABV. Além de mais de 40 espécies de quirópteros (RIO GRANDE DO SUL. CEVS SES RS, 2018), sendo duas de morcegos hematófagos (WITT *et al.*, 2019).

### **1.3 Vigilância à Raiva**

A vigilância em saúde consiste no processo contínuo e sistemático de coleta, consolidação, análise, interpretação e disseminação de dados sobre eventos relacionados à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

A vigilância da raiva animal no Brasil é realizada através de ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cabendo à este último realizar atividades específicas para o manejo das populações de morcegos hematófagos e o controle da raiva em animais de produção como bovinos, equinos e outros. O Ministério da Saúde, através dos estados e municípios, executa medidas preventivas tais como a profilaxia

antirrábica humana (uso de vacinas e imunoglobulinas antirrábicas) para pessoas expostas ao risco de contrair raiva, ações de controle e mitigação frente aos casos de raiva em animais (buscando a prevenção de casos humanos) e o bloqueio vacinal animal, se necessário, para impedir a disseminação do vírus entre as diferentes espécies. Além disso, promove a vacinação de cães e gatos através dos órgãos de saúde em campanhas massivas sob a forma de rotina vacinal, que ainda é praticada na maioria dos estados, com insumos e vacinas disponibilizados de forma gratuita pelo SUS. A exceção quanto a campanhas de vacinação de cães e gatos são os estados do sul do país. Santa Catarina e Rio Grande do Sul desde 1995 não realizam campanhas massivas de vacinação anual. A partir de 2016, o Paraná também aboliu as campanhas de vacinação de cães e gatos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O Programa Nacional de Profilaxia da Raiva Humana, instituído em 1973 pelo Ministério da Saúde, promoveu a diminuição acentuada dos casos de raiva humana, principalmente pela efetividade das campanhas de vacinação canina (WADA; ROCHA; MAIA-ELKHOURY, 2011). Entretanto, o aumento dos casos de raiva humana transmitidos por animais no ciclo silvestre, tais como morcegos, canídeos silvestres e primatas não humanos, revela a mudança do perfil epidemiológico da doença (Figura 3). Desde 2015, todos os casos de raiva humana (RH) diagnosticados no país foram associados às variantes da raiva silvestre, distribuídos da seguinte maneira, em 2021: 01 RH transmitida por raposa (canídeo silvestre - *C. thous*) no município de Chapadinha/MA; em 2020: 1 RH transmitida por morcego, AgV3, no município de Angra dos Reis/RJ, 1 RH transmitida por raposa, AgV2, no município de Catolé do Rocha/PB; em 2019: 1 RH transmitida por felino, AgV3, no município de Gravatal/ SC; em 2018: 11 RH - todos transmitidos por morcego (10 em Melgaço/PA e 01 em Ubatuba/SP); em 2017: 06 RH, todos AgV3, transmitidos por morcegos 01 em Ponte Alta do Tocantins/TO, 01 em Parnamirim/BA, 03 em Barcelos/AM e 01 transmitido por gato em Recife/PE; em 2016: 02 RH, AgV3, 01 transmitido por gato em Boa Vista/RR e 01 transmitido por morcego em Iracema/CE; e em 2015: 02 RH, 01 AgV1 transmitido por cão em Corumbá/MS e 01 AgV3 transmitido por gato em Jacaraú/PB (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Dada a ampla gama de possíveis hospedeiros silvestres, a raiva não é considerada uma doença erradicável. Mas é evitável e controlável (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; FOOKS *et al.*, 2021; RUPPRECHT; SALAHUDDIN, 2019).

**Figura 5** - Casos de Raiva Humana (RH) por espécie animal agressora no período de 2010 a 2020. Brasil, 2020.

Espécie animal	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021*	Total
Cão	1	2	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	9
Gato	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	4
Bovino	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jumento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caprino	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Suíno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Herbívoro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morcego	1	0	1	0	0	0	1	5	11	0	1	0	20
Raposa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Macaco	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Gambá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gato selvagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guaxinim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Caititu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ignorado	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>40</b>

Fonte: SVS/MS. Dados atualizados até 15/01/2022.

O sistema nacional de vigilância da raiva é baseado na análise laboratorial realizada em uma rede pública de laboratórios de saúde, agricultura e laboratórios universitários (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Esses laboratórios testam animais suspeitos, coletados por vigilância passiva, através de Imunofluorescência Direta (IFD) seguida de Prova Biológica (PB), que são ensaios reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization - WHO*) e pela Organização Mundial para Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health - OIE*) como de alta especificidade para diagnóstico do vírus da raiva (RUPPRECHT; FOOKS; BERNADETTE ABELA-RIDDER, 2018).

O Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva do Rio Grande do Sul (PECPR) se baseia essencialmente na vigilância passiva por análise de amostras de animais potencialmente transmissores da raiva e na ampla distribuição da profilaxia antirrábica humana, pré e pós exposição, fornecendo a integralidade do tratamento através do Sistema Único de Saúde (SUS).



No Rio Grande do Sul, o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), pertencente à Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR), é o laboratório referência para o diagnóstico da raiva. O método diagnóstico é composto pela IFD seguida de PB, por inoculação em camundongos ou em cultivo celular (MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA, 2008).

Na vigilância e controle da raiva, a integração entre a assistência médica e as vigilâncias epidemiológica/ambiental na coleta e interpretação dos dados é imprescindível. Para que seja tomada a decisão adequada de profilaxia de pós-exposição, os profissionais de saúde devem ter conhecimento da situação epidemiológica da raiva animal no local onde ocorreu a exposição, dos fatores de risco relacionados à espécie animal envolvida e da natureza do acidente. Da mesma forma para os médicos veterinários, que devem ter domínio da biologia do vírus rábico e do contexto epidemiológico, para decidir pela adoção ou não de medidas de bloqueio de foco e controle animal.

#### **1.4 O diagnóstico da raiva na vigilância**

Acompanhar a incidência da raiva na população animal consiste em apenas um dos objetivos do diagnóstico da raiva na vigilância e controle da doença. Para fins de vigilância, muitos aspectos podem (e devem) ser analisados através do diagnóstico animal, como por exemplo: demonstrar a presença e distribuição em diferentes espécies, direcionar esforços e determinar quais ações de controle devem ser empregadas, estabelecer a profilaxia pós-exposição adequada e documentar a ausência da doença para fins de certificação (RUPPRECHT; FOOKS; BERNADETTE ABELA-RIDDER, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Mesmo em um cenário de expressiva diminuição de casos de raiva humana, é recomendado que se monitore a circulação do vírus nos animais. Entretanto, em situação de baixa incidência da doença, é importante qualificar as amostras a serem enviadas, evitando a análise de amostras não compatíveis com casos suspeitos de raiva animal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Assim, a título de vigilância passiva, preconiza-se o envio de amostras do Sistema Nervoso Central (SNC) de animais domésticos mortos, que tenham apresentado sintomatologia

neurológica ou que tenham morrido durante o período de observação preconizado na profilaxia pós-exposição (animais agressores) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021), e no caso dos animais silvestres, recomenda-se o envio de mamíferos de qualquer espécie encontrados mortos, dado o limitado conhecimento da ocorrência de raiva nesses animais. A vigilância ativa através da detecção de anticorpos antirrâbicos neutralizantes, em soros de animais vivos, tem sido utilizada a título de pesquisa no Brasil (CORDEIRO *et al.*, 2016; JORGE *et al.*, 2010) e de forma oficial em alguns países europeus (SCHATZ *et al.*, 2014). Esta abordagem permite especular se as infecções por RABV são mais frequentes e mais amplamente distribuídas do que assumido a partir de dados de vigilância passiva.

A Imunofluorescência Direta (IFD) é considerada o ensaio primário para o diagnóstico da raiva no Brasil. Esta técnica utiliza anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas anti-râbicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado antirrâbico) e se constitui em um método sensível e de alta especificidade para diagnóstico da infecção râbica. O ensaio é realizado através da análise de impressões de fragmentos de tecido nervoso expostos ao conjugado específico e submetidos à luz ultravioleta (UV). O antígeno do RABV reage com o conjugado e, ao ser iluminado com luz ultravioleta, emite uma luz esverdeada fluorescente, permitindo a observação ao microscópio de fluorescência (com luz UV). A prova para isolamento do vírus râbico em camundongos, conhecida como prova biológica (PB), é realizada através da inoculação intracerebral de camundongos (de 21 dias de idade ou neonatos) ou em cultivo celular. O animal de eleição para o isolamento é o camundongo albino suíço, por ser um dos mais sensíveis ao RABV (MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA RAIVA, 2008).

Frente a um caso positivo de raiva animal em espécies carnívoras, deverá ser realizada a identificação da variante viral envolvida, permitindo a identificação de seu reservatório e que sejam tomadas as medidas de controle e mitigação adequadas a cada caso. A caracterização viral para identificação da variante pode se dar através das técnicas moleculares (sequenciamento parcial ou completo do genoma) ou através da tipificação antigênica (utilizando anticorpos monoclonais anti-G ou anti-N).

Para tipificação antigênica por anticorpos monoclonais (AcMs), é utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), onde um painel contendo AcMs contra diferentes isolados de

RABV permite identificar qual a variante envolvida. Os AcMs são produzidos a partir de hibridomas de camundongos, e a reatividade com o vírus a ser caracterizado é detectada através de anticorpos anti-camundongo marcados com isotiocianato de fluoresceína (BATISTA *et al.*, 2015; CHAVES, 2010; CHAVES *et al.*, 2015). Por ser produzida em altas concentrações no SNC infectado e por ser a mais conservada entre as proteínas do RABV, a proteína N é a mais utilizada para a produção dos AcMs utilizados na tipificação antigênica ((RUPPRECHT; FOOKS; BERNADETTE ABELA-RIDDER, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No Brasil utiliza-se o painel do *Centers of Diseases Control and Prevention* (CDC), Atlanta, GA, EUA, que é um dos centros colaboradores da Organização Mundial de Saúde, disponibilizado aos participantes do consórcio da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) de laboratórios de referência em raiva nas Américas (CHAVES *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). O estudo dos diferentes isolados de vários países da América permitiu a seleção de oito AcMs que detectam as variantes mais comumente encontradas no continente americano (Quadro 2).

**Quadro 2** - Painel de anticorpos monoclonais do CDC: padrão de reações para caracterização das variantes antigênicas encontradas na América Latina

Reservatório	Padrão de reatividade com os seguintes AcMs								Variantes Antigênicas (AgV)
	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	
Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Morcego-vampiro ( <i>Desmodus rotundus</i> )	-	+	+	+	+	-	-	+	3
Morceguinho-de-telhado ( <i>Tadarida brasiliensis</i> )	-	+	+	+	+	-	-	-	4
Morcego-vampiro ( <i>Desmodus rotundus</i> ) Venezuela	-	+	V	+	+	V	-	V	5
Lasiurus ( <i>Lasiurus cinereus</i> )	V	+	+	+	+	-	-	-	6
Raposa do Arizona ( <i>Urocyon cinereoargenteus</i> )	+	+	+	-	+	+	-	+	7
Cangambá ( <i>Mephitis mephitis</i> ) do Centro Sul/ EUA	-	+	+	+	+	+	+	+	8
Morceguinho-de-telhado ( <i>Tadarida brasiliensis</i> ) México	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Cangambá ( <i>Mephitis mephitis</i> ) da Baixa Califórnia/ México	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Morcego-vampiro ( <i>Desmodus rotundus</i> ) /México	-	+	+	+	-	-	-	+	11
CVS/SAD/PV/ERA	+	+	+	+	+	+	+	+	Cepa laboratorial

(+) reação positiva; (-) reação negativa; (V) reatividade variável.

Fontes: De Mattos et al. (1996); Diaz et al. (1994); World Health Organization (2019); Velasco-Villa et al., (2002)

Existem ainda 03 variantes que circulam na região nordeste do Brasil (Quadro 3), que apesar de terem perfil antigênico classificado como "não compatível", apresentam padrão antigênico constante e identificável. Como por exemplo a variante associada ao canídeo silvestre

*Cerdocyon thous* (Graxain), que apresenta padrão de reatividade similar a variante antigênica 2 (AgV2) derivada de cães, porém o AcM C1 não reage a esses isolados ou produz reatividade baixa (FAVORETTO *et al.*, 2002).

**Quadro 3** - Padrão de reações de variantes antigênicas “não compatíveis” encontradas em silvestres do Brasil

Reservatório Brasil	Padrão de reatividade com os seguintes AcMs								Variantes Antigênicas (AgV)
	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	
Graxain ( <i>Cerdocyon thous</i> )	-	+	-	+	+	+	-	+	?
Morcego-orelhudo ( <i>Histiotus velatus</i> )	-	-	-	-	+	-	-	-	?
Sagui ( <i>Callithrix jacchus</i> )	-	-	+	+	-	-	-	-	?

(+) reação positiva; (-) reação negativa.

Fonte: World Health Organization 2019.

A ocorrência da incompatibilidade de alguns isolados demonstra a limitação dos estudos sorológicos antigênicos. Ainda assim, a tipificação das variantes antigênicas por AcMs continua sendo uma boa técnica de "screening" a ser utilizada em focos de raiva animal, ou como método principal em locais onde a capacidade e/ou a disponibilidade de recursos para executar a caracterização genética através de técnicas moleculares é limitada.

A incorporação de técnicas moleculares trouxe grandes avanços para a vigilância da raiva. No diagnóstico molecular, antes da amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), o RNA é primeiro transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) usando a transcrição reversa (RT), resultando em uma variante da PCR conhecida como PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). Vários protocolos convencionais de RT-PCR foram padronizados visando as regiões conservadas do genoma, a maioria dos ensaios amplifica partes dos genes da nucleoproteína (N) e da polimerase (L). Após o diagnóstico positivo, é possível aprofundar a análise pelo sequenciamento parcial do genoma ou pela utilização de métodos de sequenciamento que recuperam o genoma completo do vírus. As técnicas de sequenciamento não são consideradas procedimentos de rotina no diagnóstico da raiva, mas são técnicas complementares para a vigilância epidemiológica, já que o estudo da dinâmica molecular das diversas variantes do

RABV, e de seus reservatórios naturais, evidenciam os antecedentes genéticos virais envolvidos na cadeia de transmissão e na troca de hospedeiros (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; NADIN-DAVIS *et al.*, 2017). Os métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos do RABV estão se tornando cada vez mais difundidos não somente para o diagnóstico da raiva, como também para caracterização genética das diferentes linhagens virais, estudos filogenéticos e evolutivos, consolidando a importância da vigilância genômica e da epidemiologia molecular da raiva, auxiliando na compreensão da dinâmica viral e na elaboração de modelos preditivos.

### **1.5 Atendimento antirrábico humano**

A garantia da profilaxia adequada e oportuna é um desafio para a prevenção da raiva. O atendimento antirrábico humano está entre os três agravos de maior número de notificações do país, com mais de 500 mil notificações por ano (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). A orientação dos órgãos de saúde para a prevenção da raiva é que seja buscada assistência médica na rede pública de atenção básica após uma mordida/agressão por qualquer animal potencialmente transmissor do RABV (mamíferos). Este tipo de atendimento é denominado atendimento antirrábico humano (AARH). A profilaxia adotada durante o AARH é diferenciada em Pós Exposição (PPE), quando a pessoa foi exposta a um animal potencialmente transmissor do RABV, e a profilaxia Pré Exposição (PPRE), recomendada a pessoas com risco de exposição permanente ao RABV. A escolha da conduta profilática se dá após anamnese completa utilizando a ficha de investigação do AARH (Figuras 6.1 e 6.2). A ficha de AARH é utilizada como uma ferramenta para tomada de decisão de conduta de profilaxia, além de ser uma forma de avaliar o serviço e funcionar como um instrumento de vigilância. As características do ferimento e da espécie animal envolvida no acidente, são determinantes para definir qual o esquema de profilaxia mais adequado à situação.

Tanto a ocorrência da raiva humana (CID: A82.9) como o atendimento antirrábico humano (CID: W64) constam da lista nacional de doenças e agravos de notificação e investigação compulsórias, descritas na Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde. O Brasil utiliza o Sistema de Informação de Agravos de Notificação

(SINAN) para registrar os AARH. Todo AARH deve ser informado por notificação individual e imediata aos níveis municipal, estadual e federal. Independente da conduta de profilaxia indicada ao paciente, as fichas de notificação e investigação deverão ser preenchidas e a investigação deve ser realizada imediatamente ou até 72 horas após a notificação. A ficha de investigação deve ser encerrada oportunamente em até 60 dias após sua abertura (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019).

Figuras 6.1 e 6.2 - Ficha de Atendimento Antirrábico Humano, frente e verso

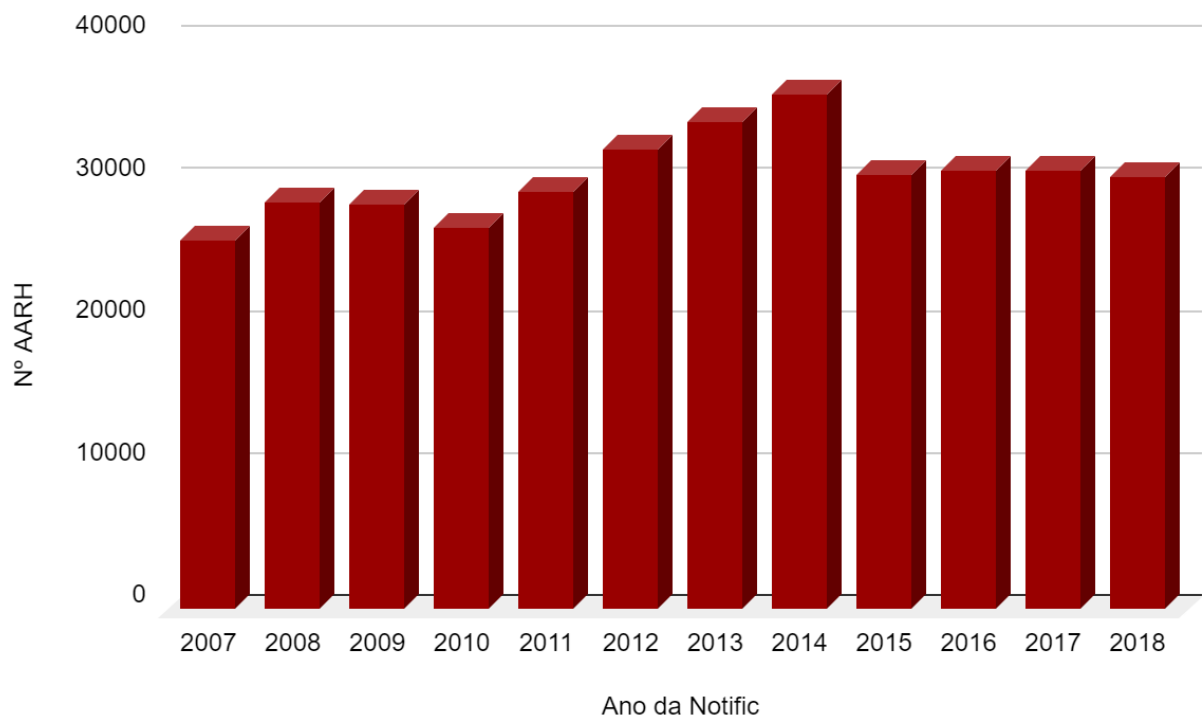
República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO		Nº						
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação 2 - Individual		HUMANO						
	2	Agravado/doença <b>ATENDIMENTO ANTI-RÁBICO HUMANO</b>		Código (CID10) W 64	3 Data da Notificação					
	4	5	Município de Notificação	Código (IBGE)						
	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7	Data do Atendimento				
	8	Nome do Paciente			9		Data de Nascimento			
	Notificação Individual	10	(ou) Idade 1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11	Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12	Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4- Idade gestacional Ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado	13	Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado	
14 Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica										
15		Número do Cartão SUS		16			Nome da mãe			
Dados de Residência		17	18	Município de Residência	Código (IBGE)	19		Distrito		
	20	Bairro		21		Logradouro (rua, avenida,...)	Código			
	22	23	Número	Complemento (apto., casa, ...)		24		Geo campo 1		
	25		Geo campo 2		26		Ponto de Referência	27	CEP	
	28		(DDD) Telefone		29		Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30		Pais (se residente fora do Brasil)
	<b>Dados Complementares do Caso</b>									
	Antecedentes Epidemiológicos	31							Ocupação	
		32							Tipo de Exposição ao Vírus Rábico 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/> Contato Indireto <input type="checkbox"/> Arranhadura <input type="checkbox"/> Lamedura <input type="checkbox"/> Mordedura <input type="checkbox"/> Outro	
33							Localização 1 - Sim 2 - Não 3 - Desconhecida <input type="checkbox"/> Mucosa <input type="checkbox"/> Cabeça/Pescoço <input type="checkbox"/> Mãos/Pés <input type="checkbox"/> Tronco <input type="checkbox"/> Membros Superiores <input type="checkbox"/> Membros Inferiores			
34							Ferimento 1 - Único 2 - Múltiplo <input type="checkbox"/> 3 - Sem ferimento 9 - Ignorado	35	Tipo de Ferimento 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/> Profundo <input type="checkbox"/> Superficial <input type="checkbox"/> Dilacerante	
36							Data da Exposição	37	Tem Antecedentes de Tratamento Anti-Rábico ? 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/> Pré-Exposição <input type="checkbox"/> Pós-Exposição	
38							Se Houve, quando foi concluído? 1 - Até 90 dias 2 - Após 90 dias	39	Nº de Doses Aplicadas	
40							Espécie do Animal Agressor 1 - Canina 2 - Felina 3 - Quiróptera (Morcego) 4 - Primata (Macaco) 5 - Raposa 6 - Herbívoro doméstico (especificar) 7 - Outra			
Tratamento Atual	41							Condição do Animal para Fins de Condução de Tratamento 1 - Sadio 2 - Suspeito 3 - Raivoso 4 - Morto/ Desaparecido	42	Animal Passível de Observação ? (Somente para Cão ou Gato) 1 - Sim 2 - Não
	43							Tratamento Indicado 1 - Pré Exposição 2 - Dispensa de Tratamento 3 - Observação do animal (se cão ou gato) 4 - Observação + Vacina 5 - Vacina 6 - Soro + Vacina 7 - Esquema de Reexposição		
	44							Vacina Laboratório Produtor Vacina 1 - Instituto Butantan 2 - Instituto Vital Brasil 3 - Aventis Pasteur 4 - Outro Especificar		
45							Número do Lote	46	Data do Vencimento	





*al.*, 2019). No mesmo período no Rio Grande do Sul a média anual de atendimentos foi de 30.392 pacientes o que equivale a incidência média de 275 atendimentos/100mil habitantes (CEVS, 2019(CEVS CENTRO ESTADUAL DE VIGILANCIA EM SAUDE, 2021; IBGE, BRASIL, 2021).

**Gráfico 1** - Número de Atendimentos Antirrábicos Humanos por ano, 2007 a 2018, RS



Fonte: SINAN/CEVS/TabNet (Dados parciais. Acesso em 12/09/2021)

Apesar de, nos últimos anos, o predomínio de casos de raiva humana no Brasil estar associado a variantes de animais silvestres, os casos de AARH devido ao contato com animais silvestres são um enorme desafio para a saúde pública, com muitos erros de prescrição da profilaxia antirrábica e desconhecimento do risco associado a morcegos e mamíferos silvestres terrestres. Um estudo recente que analisou o perfil epidemiológico dos casos de raiva humana relacionados a animais silvestres no Brasil durante o período de 2002 a 2012, demonstrou que em mais de 80% dos 82 casos de raiva humana, a profilaxia prescrita foi errada ou inexistente (ROCHA et al., 2017). No período de 2003 a 2013, no estado do Ceará, a profilaxia pós

exposição adequada foi prescrita a apenas 68% dos pacientes atacados por canídeos silvestres (CORDEIRO *et al.*, 2016). Através da análise dos dados do Ministério da Saúde na última década, estima-se que apenas 50% dos pacientes agredidos por animais silvestres no Brasil recebam a indicação correta de PPE (imunoglobulina e vacina). Ainda que os AARH associados a animais silvestres sejam menos de 2% do total de atendimentos, esses representam o maior risco para ocorrência de raiva humana no Brasil atualmente (BENAVIDES *et al.*, 2020b).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Contribuir, em diferentes abordagens, para atualização e modernização da vigilância e prevenção do vírus rábico no Rio Grande do Sul.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar levantamento das espécies silvestres relatadas nas fichas de atendimento antirrábico no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)
- Identificar locais com ocorrências repetidas de acidentes e ou interações com animais silvestres
- Realizar vigilância ativa nestes locais capturando e coletando sangue nas espécies de mamíferos silvestres relatadas nos atendimentos antirrábicos
- Realizar vigilância passiva em mamíferos silvestres resgatados no Rio Grande do Sul
- Submeter os soros de mamíferos silvestres à inibição rápida do foco fluorescente (RFFIT) para detectar anticorpos neutralizantes do vírus da raiva
- Em uma abordagem “*One health*”, identificar espécies de mamíferos que podem estar envolvidos no ciclo silvestre do vírus da raiva no sul do Brasil
- Descrever a ocorrência e perfil epidemiológico dos Atendimentos Antirrábicos Humanos no Rio Grande do Sul no período de 2015 a 2019

- Analisar condutas de AARH prescritas no RS, com foco em animais silvestres
- Divulgar os dados do inquérito sorológico em silvestres, capacitando e qualificando profissionais de saúde em regionais de saúde estratégicas
- Amplificar genomas de RABV circulantes em amostras de animais silvestres obtidas através da vigilância passiva da raiva realizada pela Secretaria Estadual de Saúde
- Recuperar genomas completos de RABV
- Amplificar, sequenciar e analisar a filogenia a partir da proteína N e de genes concatenados

### **3      CAPÍTULO I - INQUÉRITO SOROLÓGICO**

#### **3.1    Problema de pesquisa**

O AARH está em processo de mudança. O novo padrão epidemiológico e uma nova postura referente ao uso de imunobiológicos demandam o aperfeiçoamento da rede básica de saúde. A qualificação dos profissionais para que estes sejam capazes de identificar os riscos associados às diferentes espécies e tipos de acidentes, exige constante aperfeiçoamento. A raiva é um excelente exemplo de saúde única (*One Health*), onde o exame de um animal determina a conduta adotada em um humano. As redes de vigilância e de atendimento em saúde necessitam qualificar as informações sobre as espécies de maior risco, fundamentando a decisão da profilaxia adequada.

A identificação das espécies de mamíferos silvestres envolvidos no ciclo silvestre do vírus da raiva no sul do Brasil, através da detecção de anticorpos antirrâbicos nestes animais, pode aumentar o conhecimento sobre a dinâmica local do RABV e informar aos profissionais de saúde sobre as espécies de maior risco, auxiliando na tomada de decisão quanto a profilaxia antirrâbica a ser prescrita.

### 3.2 Hipóteses

- Ainda que não existam registros de casos de raiva em animais silvestres no Rio Grande do Sul, o risco associado a acidentes com mamíferos silvestres nesta região não deve ser negligenciado
- Uso do inquérito sorológico para anticorpos antirrâbicos em espécies silvestres descritas nas fichas de atendimento antirrâbico humano pode indicar as espécies de maior risco associado entre as de maior prevalência no AARH

### 3.3 Objetivos específicos deste capítulo

- Realizar levantamento das espécies silvestres relatadas nas fichas de atendimento antirrâbico no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)
- Identificar locais com ocorrências repetidas de acidentes e ou interações com animais silvestres
- Realizar vigilância ativa nestes locais capturando e coletando sangue nas espécies de mamíferos silvestres relatadas nos atendimentos antirrâbicos
- Realizar vigilância passiva em mamíferos silvestres resgatados no Rio Grande do Sul
- Submeter os soros de mamíferos silvestres à inibição rápida do foco fluorescente (RFFIT) para detectar anticorpos neutralizantes do vírus da raiva
- Identificar espécies de mamíferos que podem estar envolvidos no ciclo silvestre do vírus da raiva no sul do Brasil.

### 3.4 Metodologia

A metodologia está descrita no artigo científico "*Rabies surveillance in wild mammals in south of Brazil*" (página 36).

### **3.5 Artigo científico**

Submetido a *Transboundary and Emerging Diseases* em 24 de julho de 2019, revisado em 04 de outubro de 2019 e publicado em 01 de novembro de 2019 (DOI: 10.1111/tbed.13415).

## **4 CAPÍTULO II - ANÁLISE E QUALIFICAÇÃO DO AARH NO RS**

### **4.1 Problema de pesquisa**

Embora o RS possa ser considerado, há algum tempo, como um estado livre da raiva urbana relacionada a cães e gatos, mais de 80% dos AARH ainda são por mordida de cães. Em contrapartida, o vírus da raiva é considerado endêmico nas populações de morcegos, hematófagos e não hematófagos, o que confirma a presença do ciclo silvestre da raiva no estado. A ausência do conhecimento da atual situação epidemiológica da raiva pelos profissionais de saúde gera uso indevido de imunobiológicos, opções equivocadas de profilaxia, gastos desnecessários aos cofres públicos e riscos à saúde da população.

A análise regular dos dados de atendimento, acompanhada do compartilhamento destes resultados, e do status epidemiológico local, aos profissionais de saúde envolvidos, consolida informações que podem melhorar e orientar estratégias de vigilância e prevenção da raiva.

### **4.2 Objetivos específicos deste capítulo**

- Descrever a ocorrência e perfil epidemiológico dos atendimentos Antirrábicos Humanos no Rio Grande do Sul no período de 2015 a 2019
- Analisar condutas de AARH prescritas no RS, com foco em animais silvestres
- Divulgar os dados do inquérito sorológico em silvestres, capacitando e qualificando profissionais de saúde em regionais de saúde estratégicas

### **4.3 Metodologia**

#### 4.3.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo descritivo epidemiológico transversal, elaborado a partir da análise de dados secundários. Foram analisados aspectos qualitativos da informação (completude e consistência), o perfil epidemiológico e a conduta prescrita nos AARH no Rio Grande do Sul.

#### 4.3.2 Período do estudo

Foram analisadas as notificações de AARH no período de 2015 a 2019, ou seja, de 01 de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2019.

#### 4.3.3 Local do estudo

Como o objetivo foi analisar o AARH em todo estado do RS, os limites geográficos considerados para fins de gradiente foram as divisões administrativas em regionais de saúde, da Secretaria Estadual de Saúde.

#### 4.3.4 População do estudo

Foram incluídos todos os casos de AARH notificados no SINAN no Rio Grande do Sul no período avaliado (2015 a 2019), independente de características do paciente, ou mesmo da conduta e profilaxia adotada.

#### 4.3.5 Fonte e coleta de dados

Os dados foram exportados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), utilizando informações das fichas de notificação compulsória e de investigação, e

refletem a situação encontrada na data de exportação (baixado em 20 de outubro de 2020), sendo estes preliminares e sujeitos a frequentes atualizações. Foram extraídas informações das 60 variáveis disponíveis na ficha de notificação/investigação.

#### 4.3.6 Processamento e análise dos dados

As informações foram organizadas em um banco de dados (planilha eletrônica) e analisadas em ambiente virtual, com auxílio da ferramenta Google Colaboratory (“Colab”) utilizando a linguagem de programação Python para realizar as tabulações e cruzamento de dados. O software Tabwin também foi utilizado. Para análise dos dados foram utilizadas frequências simples e relativa e medidas de tendência central. Quanto à incompletude e inconsistência, foram analisados os campos pertencentes ao quadro "Dados Complementares do Caso" presentes na ficha. A conduta adotada para profilaxia também foi avaliada.

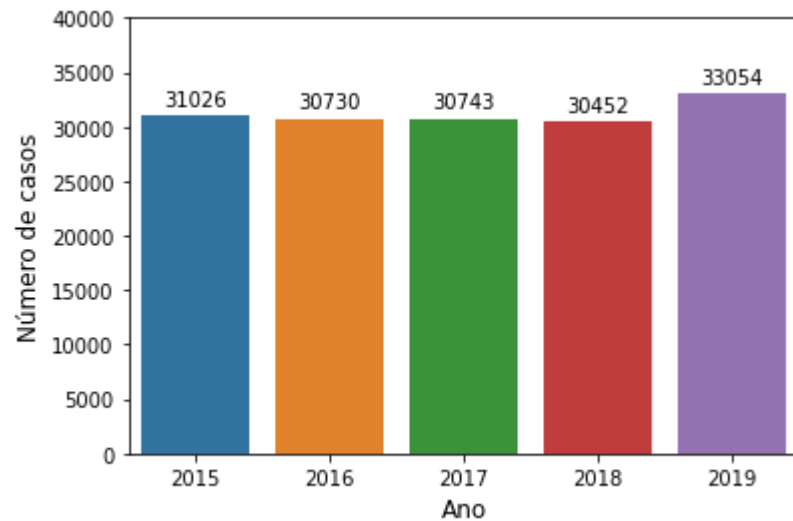
#### 4.3.7 Divulgação aos profissionais de saúde

Foram realizadas oficinas regionais, divulgando os dados do AARH no estado, o atual perfil epidemiológico da doença e os resultados da vigilância ativa em animais silvestres do RS, realizada através do inquérito sorológico.

### 4.4 Resultados

Durante a série histórica aqui avaliada (2015 a 2019), foram notificados 156.005 casos de AARH no RS.



**Gráfico 2 - N°AARH por ano, 2015 a 2019, RS**

Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

#### 4.4.1 Qualidade dos dados

Do total de notificações, 117.591 (75,38%) foram encerradas em prazo oportuno (em até 60 dias) e 30.776 (19,73%) com mais de 60 dias. Alguns dados demográficos utilizados para análise do perfil epidemiológico dos pacientes estão incompletos. Como por exemplo, em 30.987 (19,86%) não foi informado o grau de escolaridade do paciente e em 210 (0,13%) o sexo foi “ignorado”. Em 15.721 atendimentos (10,1%), não foi informado se o paciente tinha antecedentes de tratamento antirrábico, e em 16.203 (10,4%) casos de PPE não foi preenchida a informação sobre uso anterior do soro antirrábico (imunoglobulinas). Em 3.840 (2,5%) atendimentos a conduta não foi diferenciada em pré ou pós exposição.

Em 766 atendimentos, os animais envolvidos foram classificados como “Raivosos” no campo “Condição do animal para fins de conduta” e em 225 desses atendimentos esses animais “raivosos” foram classificados como passíveis de observação.

#### 4.4.2 Perfil epidemiológico

A incidência de pacientes que buscaram pelo AARH teve a média de 31.201 casos/ano, e a mediana para o período foi de 30.743.

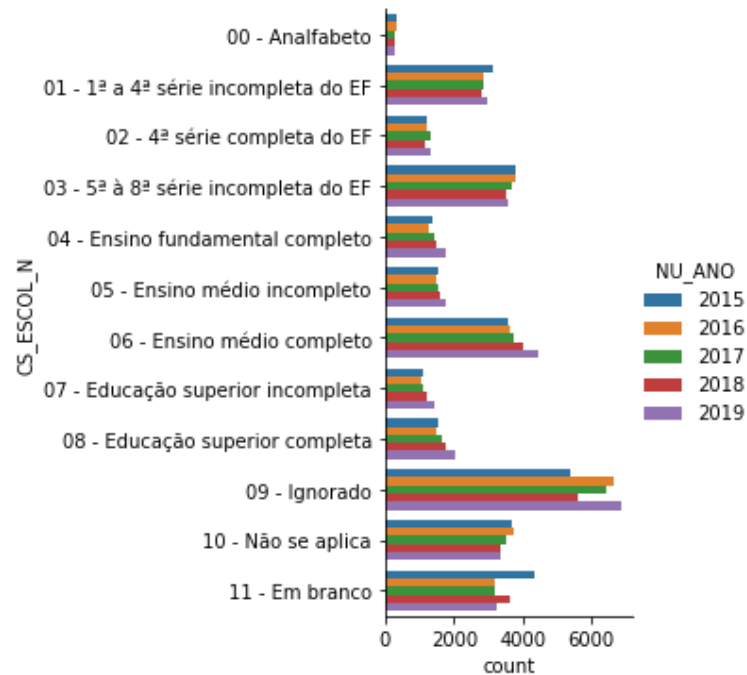
Quanto ao perfil do paciente, 51,13% eram do sexo feminino e 48,74% do sexo masculino. Na distribuição por faixa etária, observou-se que 58,12% dos AARH (n=90.672) se concentram nas faixas etárias que compreendem entre 20 e 64 anos (Quadro 4).

**Quadro 4 - Prevalência do Atendimento Antirrábico humano, 2015 a 2019, RS**

<b>Variável</b>	<b>Frequência (n)</b>	<b>Frequência Relativa</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	76032	48.74
Feminino	79763	51.13
Ignorado	210	0.13
<b>Faixa Etária SINAN</b>		
<1 Ano	1690	1,08%
1-4	10599	6,79%
5-9	13012	8,34%
10-14	10566	6,77%
15-19	9631	6,17%
20-34	30580	19,60%
35-49	28958	18,56%
50-64	31134	19,96%
65-79	16503	10,58%
80 e+	3332	2,14%
Total	156005	100,00%

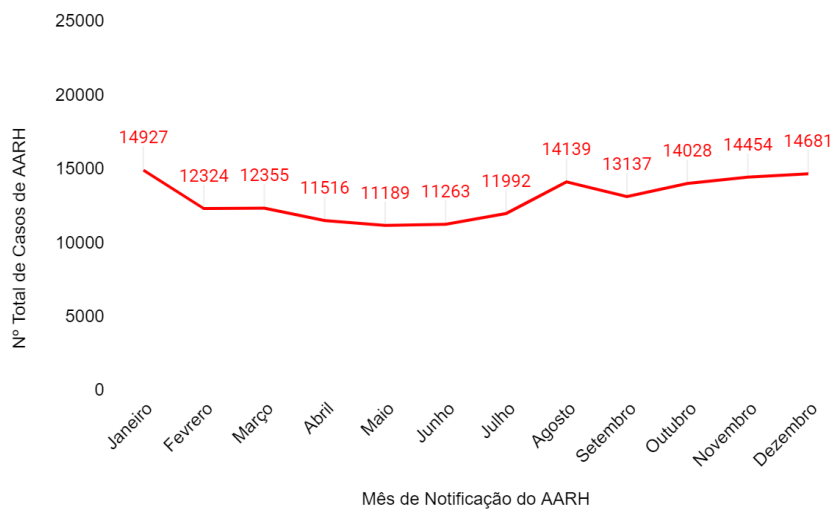
Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

O grau de escolaridade com maior frequência foi o ensino médio completo, 12,41% dos AARH foram classificados nesta categoria.

**Gráfico 3 - NºAARH por escolaridade, 2015 a 2019, RS**

Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

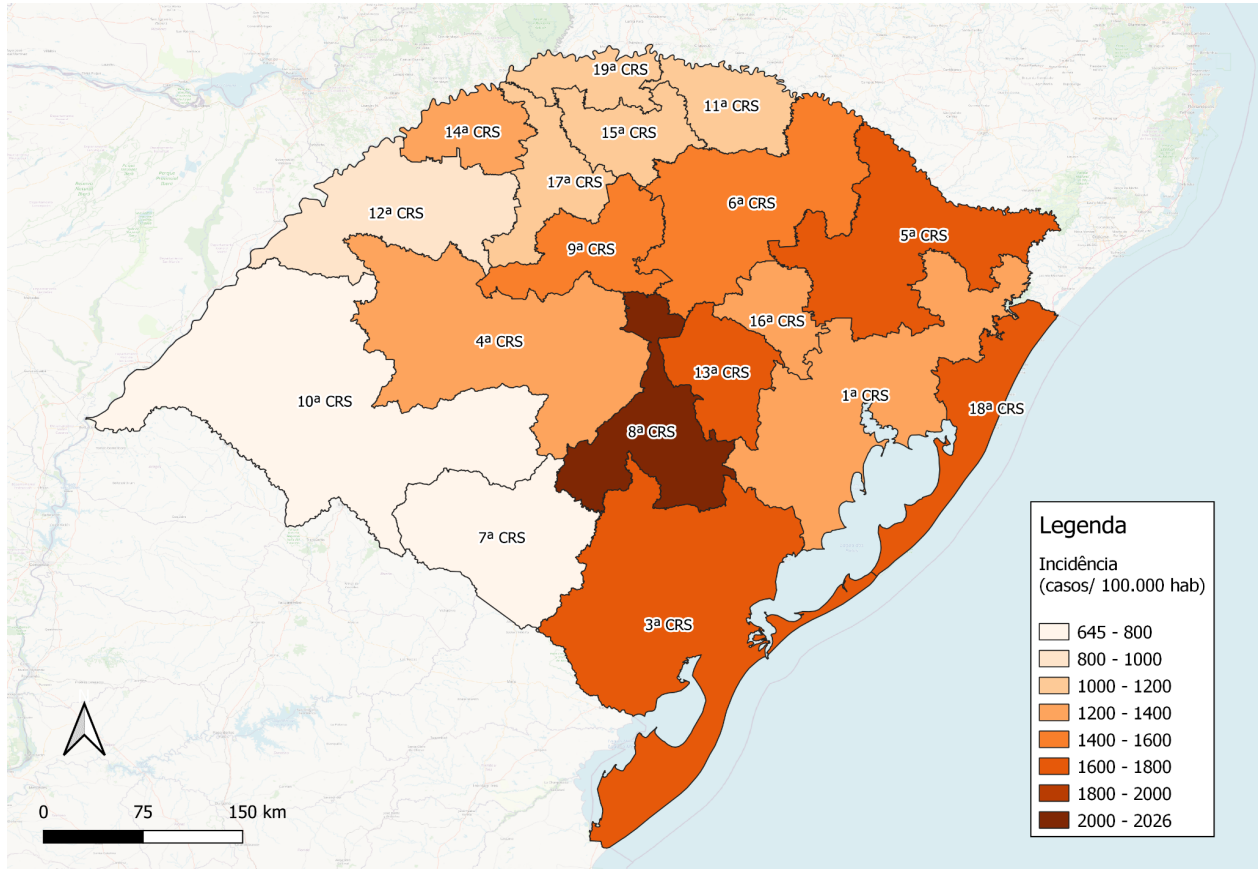
Janeiro foi o mês de maior número de casos (Gráfico 4). O mês de agosto também apareceu entre os meses com maior incidência.

**Gráfico 4 - Distribuição de casos de AARH por mês de notificação, 2015 a 2019, RS**

Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

Em relação à distribuição por local de atendimento, a regional com maior número de AARH é a 1ª CRS, que compreende a capital Porto Alegre e região metropolitana, seguida pela 5ª regional de saúde sediada em Caxias do Sul, que é o segundo município mais populoso do RS depois da capital (Figura 7).

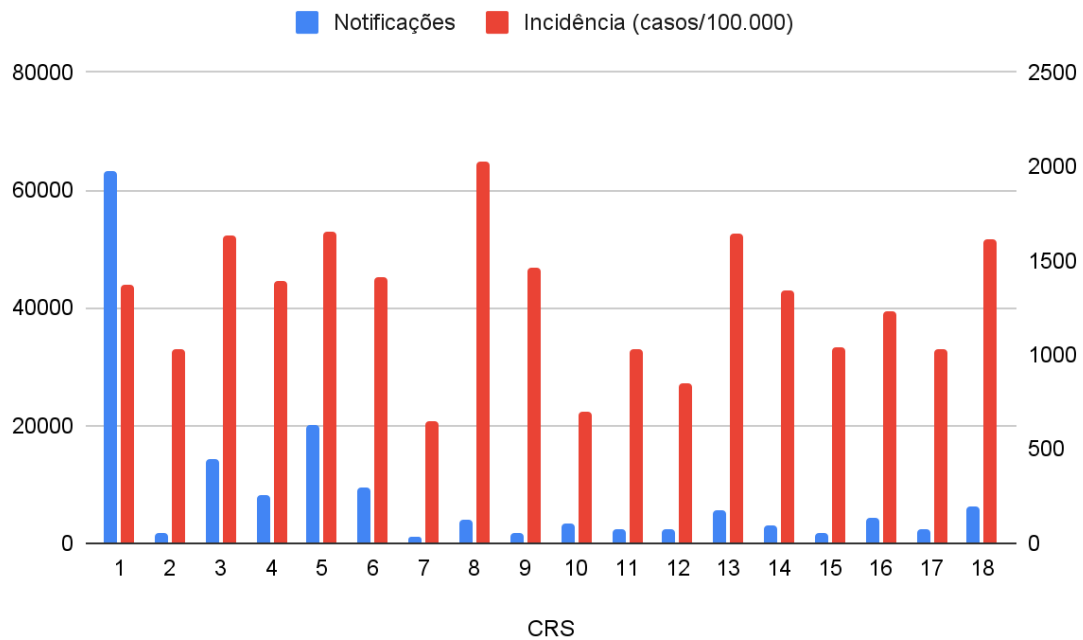
**Figura 7 - Incidência de AARH por regional de atendimento, 2015 a 2019, RS**



Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

A 8ª regional, com sede no município de Cachoeira do Sul, região central do estado, é a que apresenta a maior taxa de incidência acumulada, com 2.026 atendimentos/100 mil habitantes.

**Gráfico 5** - Número absoluto e incidência acumulada de AARH (100.000 hab.) por regional de saúde, 2015 a 2019, RS



Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

A maior parte dos AARH ocorridos no período se deram em regime de pós exposição, o que representou 98,6% dos atendimentos. Apenas 1,3% dos atendimentos eram pré-exposição.

#### 4.4.3 Dados complementares dos AARH

No período analisado, das 156.005 notificações realizadas, 149.852 (96,1%) foram por agressões envolvendo animais de companhia - cães e gatos, 881 (0,6%) foram relacionados a animais de produção - herbívoros, 1.220 (0,8%) ocorreram por animais silvestres - macaco, morcego e raposa, e em 4.040 (2,6%) AARH a espécie animal foi descrita como “outra” (Quadro 5).

**Quadro 5 - Espécie animal envolvida por ano, 2015 a 2019, RS**

Espécie	2015		2016		2017		2018		2019		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Em branco</b>	3	0,01	1	0	3	0,01	5	0,02	0	0	12	0,01
<b>Canina</b>	26824	86,46	27192	88,49	26855	87,35	26151	85,88	27449	83,04	134471	86,20
<b>Felina</b>	2732	8,81	2661	8,66	2933	9,54	3135	10,29	3920	11,86	15381	9,86
<b>Herbívora</b>	258	0,83	139	0,45	125	0,41	95	0,31	264	0,8	881	0,56
<b>Macaco</b>	56	0,18	51	0,17	50	0,16	83	0,27	92	0,28	332	0,21
<b>Morcego</b>	132	0,43	108	0,35	139	0,45	175	0,57	250	0,76	804	0,52
<b>Outra</b>	1001	3,23	568	1,85	622	2,02	785	2,58	1064	3,22	4040	2,59
<b>Raposa</b>	20	0,06	10	0,03	16	0,05	23	0,08	15	0,05	84	0,05
<b>Total</b>	31026	100	30730	100	30743	100	30452	100	33054	100	156005	100,00

Fonte: SINAN/CEVS/DVE/Antropozoonoses (Dados parciais. Acesso em 20/10/2020)

#### 4.4.4 Divulgação dos dados e qualificação dos profissionais de saúde

Durante o ano de 2019 foram realizadas 06 oficinas para profissionais de saúde em 04 regionais do estado, com o tema - *Novo Perfil Epidemiológico da Raiva*. Participaram destas oficinas mais de 200 profissionais de saúde, abrangendo um total de 158 municípios. As oficinas ocorreram nas seguintes regionais: 9ª CRS - Cruz Alta, região noroeste do estado, com 13 municípios; 5ª CRS - Caxias do Sul, região nordeste do estado, com 49 municípios (Figura 8); 6ª CRS - Passo Fundo e 11ª CRS - Erechim, ambas da região norte do estado, totalizam 95 municípios. Também foi realizada uma oficina para os profissionais de saúde da capital, Porto Alegre, abrangendo um hospital público referência ao AARH e os responsáveis pelo programa de imunizações do estado.

**Figura 8** - Oficina na 5ª CRS - Caxias do Sul, em 22/08/2019



#### **4.5 Discussão**

A avaliação da qualidade dos dados revelou incompletude de algumas informações demográficas relevantes dos pacientes atendidos. Ainda assim, a ausência desses dados não foi fator limitante a análise epidemiológica, que demonstrou a alta imprevisibilidade do AARH no que se refere ao perfil dos pacientes, não sendo possível identificar um grupo de risco na população, seja ele por sexo, faixa etária, profissão ou grau de escolaridade. Em doenças como a Febre Amarela, por exemplo, é possível delinear bem este perfil - indivíduos do sexo masculino em idade produtiva e com escolaridade superior ao ensino fundamental (FANTINI *et al.*, 2021), o que permite intensificar ações voltadas a este grupo.

Na distribuição da notificação dos casos ao longo dos anos, os meses mais quentes do ano são os de maior incidência. A incidência elevada do mês de agosto pode estar relacionada ao período reprodutivo das fêmeas de canídeos nesta região (NAGASHIMA; SONGSASEN, 2021).

A ausência de algumas informações nos dados complementares dos casos dificulta e por vezes inviabiliza a análise de qualidade do AARH prestado. Por exemplo, a não diferenciação em pré ou pós exposição não permite que se avalie se a conduta prescrita nesses atendimentos foi adequada.

O fato de o Rio Grande do Sul apresentar anualmente mais de 80% dos seus AARH devido a agressão por cães, apesar de ser por definição considerado zona livre da raiva relacionada a esta espécie, evidencia a importância da mordida de cachorro como um agravo de saúde pública. A análise dos atendimentos prestados a pacientes agredidos por cães considerados sadios no momento da agressão demonstra evolução no conhecimento dos profissionais de saúde a respeito da situação da raiva urbana no estado. Nestes casos a prescrição da conduta de apenas observar o cão sadio passou de 43% em 2015, para 80,7% em 2019. O mesmo se observa para gatos sadios, passando de 34,6% em 2015, para 75,1% em 2019. No caso da prescrição da conduta “observação mais vacina”, nos acidentes com cães sadios, o valor passou de 44% em 2015 para 8,4% em 2019. Já no resultado da observação realizada, há inconsistência das informações prestadas na condição final do animal após observação, já que 180 cães foram classificados como raivosos pelo critério clínico e 10 pelo critério laboratorial, e ainda 17 gatos raivosos pelo critério clínico e 01 gato (em 2017) pelo critério laboratorial. Não houveram casos de cães com raiva no período de 2015 a 2019 e o único gato positivo ocorreu em 2015. A classificação de cães e gatos como “raivosos” no campo “Condição do animal para fins de conduta” e ainda assim colocar esses animais como passíveis de observação, aponta para o desconhecimento do protocolo preconizado e para dificuldade do profissional de saúde em avaliar a saúde do animal envolvido.

Apesar de representarem menos de 1% dos AARH prestados, os casos relacionados aos animais silvestres representam a maior fonte de preocupação aos órgãos de saúde. Todos os acidentes com silvestres são classificados como graves e demandam profilaxia completa com imunoglobulina (heteróloga ou homóloga) e vacina. Não indicar a profilaxia completa incorre em



grande risco para ocorrência de raiva humana. Comparando apenas o ano de 2019 em relação a 2018, o RS apresentou aumento de 42,86% nos acidentes com morcegos e 10,84% nos acidentes com primatas não humanos. Ainda assim, a percentagem de acidentes com morcegos no RS (0,52%) é inferior aos valores encontrados em SP (0,8%)(ANDRADE, 2021) e RJ (1,4%)(NASCIMENTO *et al.*, 2019). Chama atenção também o aumento em mais de 25% no número de AARH relacionado a acidentes com gatos, coerente com a crescente importância desta espécie na transmissão da raiva de morcegos a humanos.

Ao analisarmos a série histórica de 2015 a 2019, constata-se que apenas 66% dos pacientes agredidos por animais silvestres atendidos no estado receberam a profilaxia adequada. Ou seja, durante este período 412 pessoas receberam profilaxia inadequada ou inexistente. De maior preocupação são os casos de acidentes com morcegos que não receberam o protocolo completo, dada a situação endêmica do RABV em morcegos no estado. Em 26,8% dos 804 casos registrados por morcegos, a profilaxia foi inadequada/inexistente. Os que tiveram profilaxia inexistente são representados por pelo menos 22 pessoas que foram agredidas por morcegos e procuraram a rede assistencial em busca de auxílio médico, mas foram enviadas para casa sem nenhuma profilaxia antirrábica, com a conduta “dispensa de tratamento”. Em todos os anos analisados houve caso da prescrição “observação do animal” para acidentes com morcegos. Animais silvestres não são passíveis de observação.

Ainda que os canídeos silvestres sejam reconhecidos como reservatórios importantes para o RABV na região NE do Brasil, e que sejam espécies relativamente abundante no RS, os AARH devido a raposas foram os que tiveram maior erro de prescrição: apenas 52% das pessoas agredidas receberam a profilaxia adequada. No estado de SP, 57% dos agredidos por raposas no período de 2013 a 2017 receberam vacinação apenas(ANDRADE, 2021). No período analisado tivemos uma média de 17 acidentes por raposa/ano no RS.

A realização de oficinas, com a discussão dos dados do AARH com os profissionais de saúde que atuam diretamente na assistência, permitiu inferir que há o desconhecimento do ciclo da raiva relacionado a espécies silvestres e que a análise da gravidade do acidente é associada, principalmente, ao aspecto do ferimento e não à espécie agressora, o que leva a erros na indicação da profilaxia. Outra grande dificuldade relatada é a identificação das espécies

envolvidas, que não sejam cães e gatos, principalmente em espécies silvestres. Muitas vezes nomes regionalizados são utilizados, por exemplo: graxaim, zorro, sorro, raposa e cachorro do mato podem estar se referindo à mesma espécie. Relatos de marsupiais identificados pelos pacientes como “ratazana com mais de 5 kg” também não são incomuns. A apresentação dos resultados do inquérito sorológico, demonstrando a detecção de anticorpos antirrâbicos em primatas e canídeos silvestres do estado, causou surpresa em todas as oficinas realizadas, mostrando que muitas lacunas persistem no conhecimento sobre a dinâmica da raiva no RS.

O presente capítulo teve como objetivo divulgar o perfil epidemiológico e analisar a conduta prescrita nos AARH do RS no período de 2015 a 2019. Os resultados mostraram que o reconhecimento do novo padrão epidemiológico da raiva, com especial atenção ao ciclo silvestre, e o uso racional de imunobiológicos, demandam aperfeiçoamento da rede básica de saúde e informações da vigilância à raiva divulgadas de forma permanente. A produção de dados consistentes, tais como a comprovação da exposição de primatas e canídeos silvestres do RS ao vírus rábico, materializam o perigo destes acidentes e qualificam a comunicação de risco repassada aos profissionais de saúde, proporcionando a estes maior segurança na hora de decidir a profilaxia. Além disso, ações de educação continuada sobre a importância da notificação correta e bem preenchida também são necessárias, pois as ações da vigilância são essencialmente guiadas através dos dados epidemiológicos obtidos pelos sistemas de informação preenchidos pela assistência, gerando um ciclo virtuoso entre assistência e vigilância. Aprimorar esses dados resulta em: melhorias nas ações da vigilância e nas informações geradas que são repassadas à assistência, na precisão da assistência na hora de escolher a melhor conduta de profilaxia e, por consequência, na qualificação da prevenção à raiva humana no Rio Grande do Sul.

## 5 CAPÍTULO III - VIGILÂNCIA GENÔMICA

### 5.1 Problema de pesquisa

A vigilância da raiva no Rio Grande do Sul, e no Brasil, se baseia no exame qualitativo de imunofluorescência e prova biológica. A ecoepidemiologia do RABV, incluindo informações tais como linhagens mais prevalentes, filogenia e sazonalidade são pouco conhecidas no estado.

Os dados obtidos a partir da análise molecular podem fornecer informações importantes sobre a disseminação e a manutenção do RABV em um dado território, auxiliando no direcionamento dos esforços de controle. Muitos são os benefícios associados a adoção da vigilância molecular da raiva, dentre estes, destacam-se:

- Identificação de mudança e eventual adaptação a novos hospedeiros
- Avaliação da ocorrência e distribuição das linhagens no território pesquisado
- Identificação da emergência e extinção de linhagens virais
- Monitoramento da reintrodução de linhagens em territórios controlados por vacinação
- Identificação da origem de casos importados

Nos últimos 3 anos, uma média anual de 335 amostras (IC 95%: 271 a 399) de morcegos envolvidos em agressões ou interações com pessoas e/ou animais domésticos, foram enviadas para o diagnóstico da raiva no Rio Grande do Sul. A taxa média de positividade para raiva destes morcegos foi de 2,32% (95% IC: 1,04% a 3,60%). Além disso, os episódios de raiva ocorridos no estado nas últimas décadas se restringem a casos em animais e estes são predominantemente relacionados a morcegos. Considerando a situação epidemiológica atual e a ocorrência endêmica da raiva em morcegos, acredita-se que a utilização da caracterização molecular e da vigilância genômica acrescentará informações sobre a dinâmica viral no estado e também sobre a epizootiologia da raiva em morcegos, auxiliando no direcionamento e elaboração das políticas de prevenção do Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva (PECPR).

## 5.2 Objetivos específicos deste capítulo

- Amplificar genomas das variantes virais de RABV circulantes em amostras de animais silvestres, obtidas através da vigilância passiva da raiva realizada pela Secretaria Estadual de Saúde
- Recuperar genomas completos de RABV
- Amplificar, sequenciar e analisar a filogenia a partir das sequências da proteína N e dos genes concatenados

## 5.3 Hipóteses

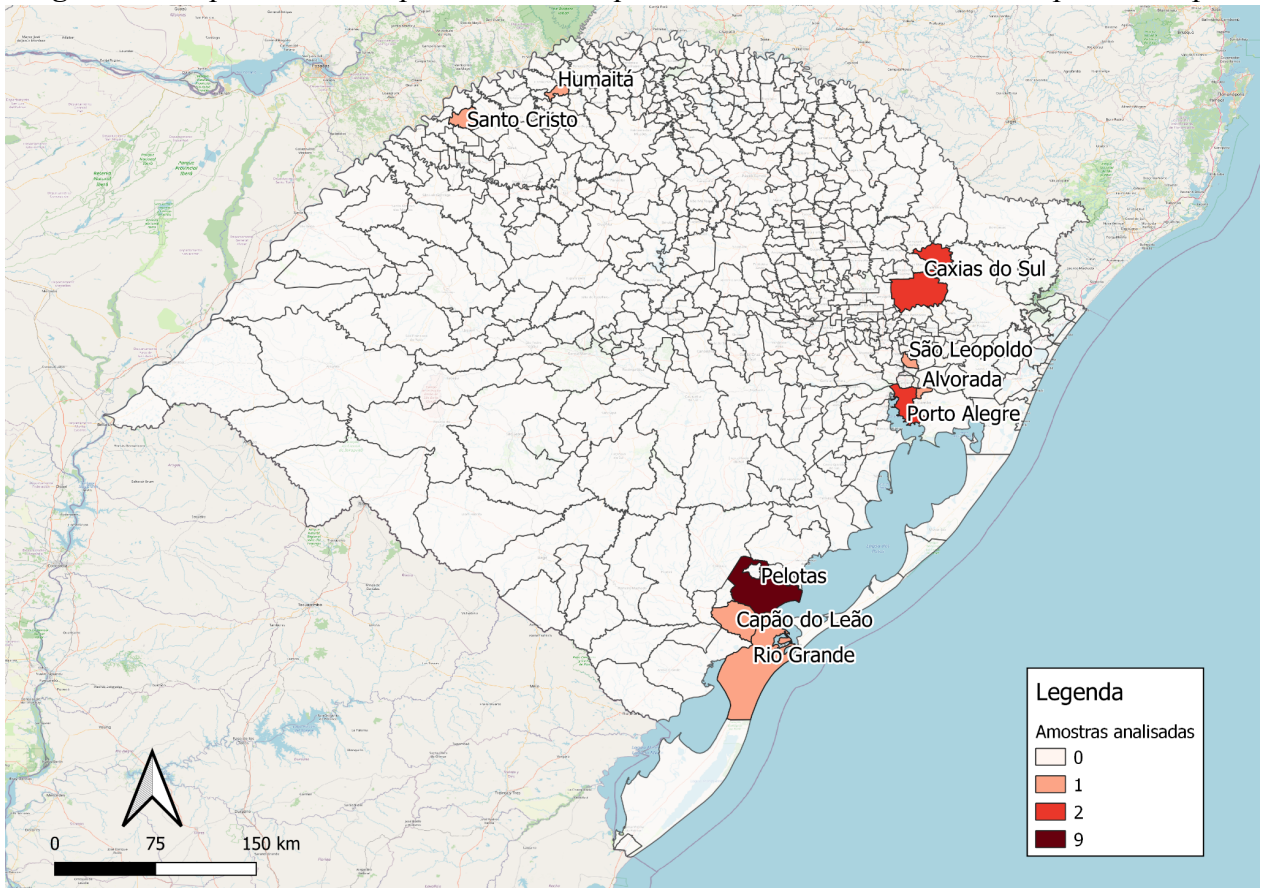
- Há mais de uma variante e distintas linhagens genéticas circulando nestes animais no RS?
- A aparente endemicidade dos ciclos enzoóticos em morcegos não hematófagos do RS se origina de um ciclo perene ou de sucessivas entradas seguidas de extinção e reintrodução?

## 5.4 Metodologia

### 5.4.1 Amostras

As amostras de tecido nervoso de morcegos analisadas no presente trabalho e seus dados foram obtidos através das ações regulares de vigilância passiva do PECPR. As amostras correspondem a 19 morcegos coletados nos anos de 2017, 2020 e 2021, distribuídas em 09 municípios do Rio Grande do Sul, encaminhadas por profissionais de saúde pública municipais para o diagnóstico da raiva (Figura 9).

**Figura 9 - Mapa com municípios de coleta e quantidade de amostras analisadas por município**



As espécies de morcegos foram identificadas por biólogos da Secretaria Estadual de Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul (SEAPDR), através de exame morfológico no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). O critério de escolha das amostras foi o de conveniência, levando em consideração a qualidade e a quantidade de amostra disponível.

**Quadro 6** - Amostras analisadas: espécies de morcegos coletados e origem geográfica das amostras

Ano Coleta	Nome da Amostra	Família	Espécie	Município
2017	981_17	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas
2017	980_17	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas
2020	644_20	<i>Molossidae</i>	<i>Molossus molossus</i>	Rio Grande
2020	654_20	<i>Vespertilionidae</i>	<i>Myotis albescens</i>	Pelotas
2020	753_20	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas
2020	804_20	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Caxias do Sul
2020	805_20	<i>Vespertilionidae</i>	<i>Eptesicus sp</i>	Caxias do Sul
2020	2211_20	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus lituratus</i>	Humaitá
2020	2221_20	<i>Molossidae</i>	<i>Molossus currentium</i>	Pelotas
2020	2281_20	<i>Molossidae</i>	<i>Molossus sp</i>	Alvorada
2021	310_21	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas
2021	318_21	<i>Vespertilionidae</i>	<i>Histiotus montanus</i>	São Leopoldo
2021	460_21	<i>Vespertilionidae</i>	<i>Myotis levis</i>	Pelotas
2021	783_21	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Porto Alegre
2021	1145_21	<i>Phyllostomidae</i>	<i>Desmodus rotundus</i>	Santo Cristo
2021	1209_21	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Porto Alegre
2021	1548_21	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Capão do Leão
2021	1631_21	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas
2021	1632_21	<i>Molossidae</i>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pelotas

#### 5.4.2 Diagnóstico da Raiva

O diagnóstico da raiva foi realizado através da IFD e PB no IPVDF, em Eldorado do Sul, RS.

#### 5.4.3 Amplificação e sequenciamento

Para análise genômica foi utilizado sequenciamento de alto rendimento, utilizando *primers* que cobrem todo o genoma do RABV, de maneira intercalada e com sobreposição, para sequenciamento na plataforma portátil *MinION*, da Oxford Nanopore Technologie (JOHNSON *et*

*al.*, 2017). Esquemas de *primers multiplex* foram desenhados para o RABV utilizando *software online Primal Scheme* (QUICK *et al.*, 2017). Configurações foram aplicadas para gerar *primers* para *amplicons* de 400 bp de todo o genoma (~ 11920bp), com uma sobreposição de 50bp. Para isso, um conjunto de 08 sequências referências de RABV de morcegos não hematófagos, provenientes do Brasil, Chile, Argentina e Estados Unidos (JQ685925, JQ685898, KM594026, KM594028, JQ685955, EU293116, MG458305, KM594038), com identidade mínima de 87,3%, foram selecionadas através do *software RABV-GLUE* e alinhadas para gerar um consenso, a partir do qual foram desenhados os *primers*, conforme orientações do *software*. O *RABV-GLUE* é uma ferramenta online para análise de genoma, genotipagem automatizada e interpretação de dados de sequências do vírus da raiva (disponível em <http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/>). As amostras foram submetidas ao protocolo de síntese de cDNA usando kit *Protoscript II First Strand Sequencing* (E6560, New England Biolabs-NEB) conforme instruções do fabricante. Em seguida, um *multiplex tiling* PCR foi realizado com o cDNA, utilizando o esquema de *primers* RABV desenhado e Q5 DNA polimerase de alta fidelidade (NEB). Os produtos de PCR foram purificados utilizando *beads* de imobilização reversível em fase sólida (SPRI) 1x (*Ampure XP*, Beckman-Coulter) e as concentrações de ácidos nucleicos foram determinadas usando um kit *Qubit dsDNA* de alta sensibilidade (Q32851, ThermoFisher) em um *Qubit 3.0* fluorímetro (ThermoFisher). A preparação da biblioteca de DNA foi realizada usando o kit de sequenciamento *Ligation SQK-LSK309* (Oxford Nanopore Technologies) e o kit de *Barcodes Native* (EXP-NBD104 e EXP-NBD114; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). O sequenciamento foi realizado em 02 corridas, ambas com a mesma metodologia, utilizando *Flowcell R9.4* (Oxford Nanopore Technologies) e sequenciadas por 6 a 18 horas usando o *software MiKNOW*. O pacote *RAMPART* (versão 1.2.0, *ARTIC Network*) foi usado para monitorar a profundidade e cobertura dos genomas. Nos arquivos fasta resultantes foi feito o *basecalling* e o *demultiplex* usando *Guppy* (Versão 4.4.2, Oxford Nanopore Technologies). A montagem do genoma consenso foi feita com *Medaka* (Versão 1.0.3, Oxford Nanopore Technologies) usando a sequência KM594038 como o genoma de referência. Também foi feita uma montagem tendo por referência o genoma KX148100, que ao *BLAST* do *NCBI* (DATABASE

RESOURCES OF THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2016) apresentou identidade às *reads* geradas nos sequenciamentos.

Para as etapas de bioinformática referentes ao sequenciamento foi utilizado fluxo de trabalho (*pipeline*) de código aberto da rede *ARTIC* (QUICK et al., 2017), versão para RABV, para gerar as sequências consenso para cada amostra identificada pelo *Barcode* correspondente. Após a obtenção dos genomas consenso, as sequências nucleotídicas foram editadas com os programas *Geneious Prime* (BIOMATTERS INC, 2022) e *MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version* (KUMAR et al., 2018) e alinhadas no *Geneious* pelo método de alinhamento múltiplo com *MAFFT* v.7.480 (KATO; STANDLEY, 2013). Todos os genomas completos recuperados e sequências parciais que alcançaram mais de 90% de cobertura do gene estão sendo submetidas ao *Genbank*, através do *BioProject* ID PRJNA796942.

#### 5.4.4 Análise Filogenética

A filogenia foi realizada a partir do gene N nas 09 amostras que tiveram 100% deste gene sequenciado. Em 12 amostras que tiveram melhor completude das proteínas G e L (57.59% a 100% de cobertura), foi realizada a filogenia por genes concatenados. Por apresentarem taxas de substituição de nucleotídeos parecidas, os genes G e L são os que apresentam melhores resultados para filogenia de genes concatenados dos RABV's (OLIVEIRA et al., 2020). Devido ao número limitado de amostras que tiveram cobertura em 100% do genoma, a filogenia pelo genoma completo não foi realizada.

Para a análise filogenética, foi baixado um banco de 67 sequências de genomas completos de RABV de morcegos do continente americano, excluídas as regiões *leader 5'* e *trailer 3'*, disponíveis no *GenBank*, independente de espécie ou data de coleta. Adicionalmente, para avaliar um possível viés de metodologia na filogenia comparando apenas com amostras de RABV's de genomas completos, foi realizada uma análise de filogenia da nucleoproteína (N) incluindo 51 sequências parciais (586 a 1423 nucleotídeos) de RABV's de morcegos do continente americano.



A ferramenta online *RABV-GLUE* (<http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/rabvFastaAnalysis> acessado em 18 de janeiro de 2022) foi utilizada na genotipagem automatizada para identificação de clado maior/menor.

Para a escolha do modelo de cálculo de substituições de nucleotídeos e construção das árvores, foi utilizada análise *online* do *NGPhylogeny* (DEREEPER et al., 2008; LEMOINE et al., 2019), que promove a análise automatizada desde o *input* do arquivo FASTA até a geração final da árvore, através de *pipeline* pré-estabelecido utilizando ferramentas robustas e já amplamente utilizadas. Para ambas as abordagens, gene individual e concatenado, optou-se pelo método “*A la Carte*”, que consiste em um pipeline semi-automático que permite a customização dos parâmetros e das ferramentas padrões a serem utilizadas. O fluxo escolhido foi: input dos dados FASTA → alinhamento pelo MAFFT → curadoria do alinhamento pelo BMGE - *Block Mapping and Gathering with Entropy* (CRISCUOLO; GRIBALDO, 2010) → Inferência das árvores por máxima-verossimilhança pelo PhyML (GUINDON et al., 2010) → Renderização das árvores pelo Newick Display (JUNIER; ZDOBNOV, 2010). O modelo de cálculo de substituições determinado pelo *NGPhylogeny* foi o GTR (*general time reversible*) com proporção de sítios invariantes estimada pelo algoritmo e 4 parâmetros para a frequência das bases. As árvores filogenéticas a partir dos diferentes conjuntos de dados (gene individual e genes concatenados) foram estimadas usando o método de máxima verossimilhança (ML). A robustez da configuração dos clados na filogenia foi estimada usando 1.000 réplicas de bootstrap para ambos conjuntos de dados. As árvores foram visualizadas e editadas no programa *FigTree* ([tree.bio.ed.ac.uk/](http://tree.bio.ed.ac.uk/)) e na ferramenta online *iTOL* (LETUNIC; BORK, 2021).

## 5.5 Resultados

Das 19 amostras utilizadas, 17 apresentaram condições de sequenciamento (02 amostras não amplificaram os ácidos nucleicos). Dessas 17 amostras, 15 foram sequenciadas por nanoporos com a plataforma *MinION*. Uma corrida foi realizada na UNB, Laboratório de Baculovírus, em Brasília, DF, e outra no Centro Estadual de Vigilância em Saúde, da SES RS, em Porto Alegre, RS. Duas amostras, a 980\_17 e a 981\_17, foram sequenciadas com a plataforma

*HiSeq*, da *Illumina*, em 2017, na *Animal Plant and Health Agency* (APHA) no Reino Unido. Por se tratarem de genoma completo de amostras oriundas da vigilância da raiva do RS, elas também foram incluídas neste estudo.

Em 09 amostras foi recuperado o gene completo da proteína N, em 5 amostras foi recuperado 100% da P, em 6 amostras 100% da M, em 06 amostras 100% da G e em 07 amostras o gene completo da L. Foram obtidos 03 genomas completos, com 100% de cobertura em todas as 5 proteínas: 02 através do sequenciamento *Illumina* e 01 do *MinION* (Quadro 7). Todas as amostras, independente da cobertura do genoma, tiveram identidade ao RABV de morcegos na análise do *BLAST* do NCBI e no *RABV-GLUE*.

Na análise automatizada de clados realizada pelo *RABV-GLUE*, a maior parte das amostras foi atribuída ao clado menor TB2. Pela análise do gene N, 08 amostras foram identificadas como TB2 e 01 como DR (Quadro 8). Pela análise concatenada dos genes G e L, 09 amostras agruparam no clado TB2, 01 no clado DR e 02 foram classificadas em clados ainda não caracterizados (Quadro 9).

As árvores filogenéticas geradas (Figuras 10 e 11) tiveram resultados coerentes com a classificação automatizada do *RABV-GLUE*. O clado TB2, onde agrupa a maioria das amostras, é composto exclusivamente de RABV obtido a partir de espécies insetívoras de morcegos da América do Sul. O clado DR tem predomínio de amostras do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, a maioria proveniente do Brasil.

Na filogenia individual pelo gene N com o banco de genomas completos (Figura 10), as 09 amostras segregaram em 2 clados distintos, classificados em TB2 e DR. No clado TB2, composto por 13 sequências oriundas da Argentina, Brasil e Chile, um ramo monofilético reúne 07 amostras deste estudo e mais duas do Instituto Pasteur, SP, incluindo a sequência KM594038 que foi referência para a elaboração dos *primers*. A amostra 318\_21, apesar de ter se posicionado no TB2, não agregou com as demais. A identidade nucleotídica média das sequências do gene N TB2 foi de 98,6% e a de aminoácidos 99,5%. A única sequência de gene N do clado DR (2211-20) agregou em um ramo bem suportado, com alto valor de bootstrap, com amostras de *D. rotundus* do Brasil e da Guiana Francesa. A identidade nucleotídica média das sequências de gene N no clado DR foi de 97,6% e a de aminoácidos 99,6%.

Na filogenia pela N oriunda de sequências parciais e genomas completos (Figura 12), a topologia permaneceu a mesma. A amostra 318\_21 permaneceu no clado TB2 e não se agregou às demais.

Na filogenia dos genes G e L concatenados (Figura 11), as amostras que se agruparam no clado TB2 tiveram identidade nucleotídica média intra clado de 96,2%. No clado DR a topologia dos genes concatenados foi idêntica a do gene N individual, porém a identidade nucleotídica média nesta abordagem foi menor, com valor de 91,5%. A amostra de *Eptesicus sp* (805\_20) ficou em um ramo isolado divergente do clado LI, composto por 02 indivíduos do gênero *Dasypterus* da América do Norte. A amostra de *Myotis sp* também se posicionou em um ramo isolado, divergente de um clado não denominado ao *RABV-GLUE*, composto exclusivamente por indivíduos da espécie *Myotis nigricans*, do Brasil.

**Quadro 7** - Dados dos sequenciamentos: dados das 17 amostras trabalhadas. As 12 amostras realçadas em verde foram incluídas nas análises de filogenia. Realçados em vermelho estão os genes que não alcançaram 100% de cobertura

Nome_Família_Corrída	Espécie	Sequência de referência mais próxima	Cobertura da Região Codificante				
			N	P	M	G	L
980_17_Molossidae_APHA	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
981_17_Molossidae_APHA	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
644_20_Molossidae_RS01	<i>Molossus molossus</i>	EU293116	100.00%	69.69%	100.00%	100.00%	100.00%
753_20_Molossidae_RS01	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	69.69%	100.00%	100.00%	100.00%
804_20_Molossidae_RS01	<i>Tadarida brasiliensis</i>	JQ685956	24.98%	0.00%	0.00%	38.03%	5.01%
805_20_Vespertilionidae_RS01	<i>Eptesicus sp</i>	JQ685956	80.49%	14.54%	3.45%	95.17%	71.16%
2211_20_Phyllostomidae_RS01	<i>Artibeus lituratus</i>	KX148100	100.00%	37.81%	9.36%	57.59%	77.07%
2221_20_Molossidae_RS01	<i>Molossus currentium</i>	KX148100	60.38%	14.43%	0.00%	20.70%	46.82%
2281_20_Molossidae_RS02	<i>Molossus sp</i>	KX148100	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	5.30%
310_21_Molossidae_RS01	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	69.69%	100.00%	100.00%	100.00%
318_21_Vespertilionidae_RS01	<i>Histiotus montanus</i>	EU293116	100.00%	45.97%	0.00%	73.90%	86.45%
460_21_Vespertilionidae_RS01	<i>Myotis levis</i>	EU293116	96.90%	0.00%	0.00%	61.33%	80.93%
783_21_Phyllostomidae_RS01	<i>Artibeus fimbriatus</i>	KX148100	77.16%	0.00%	0.00%	43.30%	25.99%
1209_21_Molossidae_RS2	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	36.29%	44.63%	3.45%	25.59%	26.04%
1548_21_Molossidae_RS02	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	80.49%	100.00%	59.28%	86.60%	95.94%
1631_21_Molossidae_RS02	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	100.00%	59.11%	99.94%	100.00%
1632_21_Molossidae_RS02	<i>Tadarida brasiliensis</i>	EU293116	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

APHA: Sequenciamento *Illumina* realizado na APHA

RS01: Sequenciamento *MinION* realizado na UNB

RS02: Sequenciamento *MinION* realizado no CEVS

**Quadro 8** - Análise automatizada gene N em 09 amostras

Nome_Especie_Ano	Clado Maior	Clado menor	Cobertura N
310_21_Tadarida_brasiliensis_021	Bats	Bats TB2	100.00%
318_21_Histiotus_montanus_2021	Bats	Bats TB2	100.00%
644_20_Molossus_molossus_2020	Bats	Bats TB2	100.00%
753_20_Tadarida_brasiliensis_2020	Bats	Bats TB2	100.00%
980_17_Tadarida_brasiliensis_2017	Bats	Bats TB2	100.00%
981_17_Tadarida_brasiliensis_2017	Bats	Bats TB2	100.00%
1631_21_Tadarida_brasiliensis_2021	Bats	Bats TB2	100.00%
1632_21_Tadarida_brasiliensis_2021	Bats	Bats TB2	100.00%
2211_20_Artibeus_lituratus_2020	Bats	Bats DR	100.00%

**Quadro 9** - Análise automatizada genes G e L em 12 amostras

Nome_Espécie_Ano	Clado Maior	Clado Menor	Cobertura	
			G	L
310_21_Tadarida_brasiliensis_021	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
318_21_Histiotus_montanus_2021	Bats	Bats TB2	73.90%	85.75%
460_21_Myotis_levis_2020	Bats	unknown	61.27%	80.20%
644_20_Molossus_molossus_2020	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
753_20_Tadarida_brasiliensis_2020	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
805_20_Eptesicus_sp_2020	Bats	unknown	95.17%	71.16%
980_17_Tadarida_brasiliensis_2017	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
981_17_Tadarida_brasiliensis_2017	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
1548_21_Tadarida_brasiliensis_2021	Bats	Bats TB2	86.60%	95.24%
1631_21_Tadarida_brasiliensis_2021	Bats	Bats TB2	99.94%	99.30%
1632_21_Tadarida_brasiliensis_2021	Bats	Bats TB2	100.00%	99.30%
2211_20_Artibeus_lituratus_2020	Bats	Bats DR	57.59%	76.37%

**Quadro 10** - Matriz de distância da identidade nucleotídica em amostras que obtiveram 100% de cobertura do gene N, em estilo de números e mapa de calor

	310_21	753_20	1631_21	1632_21	981_17	980_17	644_20	318_21	2211_20
310_21 Tadarida		99.852	99.852	99.704	99.630	99.704	99.409	95.177	91.075
753_20 Tadarida	99.852		99.704	99.557	99.483	99.557	99.261	95.103	91.075
1631_21 Tadarida	99.852	99.704		99.557	99.483	99.557	99.261	95.030	91.075
1632_21 Tadarida	99.704	99.557	99.557		99.335	99.409	99.113	94.882	90.928
981_17 Tadarida	99.630	99.483	99.483	99.335		99.483	99.039	94.808	91.075
980_17 Tadarida	99.704	99.557	99.557	99.409	99.483		99.113	94.882	91.075
644_20 Molossus	99.409	99.261	99.261	99.113	99.039	99.113		94.734	90.484
318_21 Histiotus	95.177	95.103	95.030	94.882	94.808	94.882	94.734		90.170
2211_20 Artibeus	91.075	91.075	91.075	90.928	91.075	91.075	90.484	90.170	

**Quadro 11** - Matriz de distância da identidade de aminoácidos em amostras que obtiveram 100% de cobertura do gene N, em estilo de números e mapa de calor

Amostra	310_21	753_20	981_17	1631_21	1632_21	980_17	644_20	2211_20	318_21
310_21 Tadarida		100.000	100.000	100.000	100.000	99.778	99.778	97.333	98.253
753_20 Tadarida	100.000		100.000	100.000	100.000	99.778	99.778	97.333	98.253
981_17 Tadarida	100.000	100.000		100.000	100.000	99.778	99.778	97.333	98.253
1631_21 Tadarida	100.000	100.000	100.000		100.000	99.778	99.778	97.333	98.253
1632_21 Tadarida	100.000	100.000	100.000	100.000		99.778	99.778	97.333	98.253
980_17 Tadarida	99.778	99.778	99.778	99.778	99.778		99.556	97.111	98.030
644_20 Molossus	99.778	99.778	99.778	99.778	99.778	99.556		97.111	98.030
2211_20 Artibeus	97.333	97.333	97.333	97.333	97.333	97.111	97.111		96.475
318_21 Histiotus	98.253	98.253	98.253	98.253	98.253	98.030	98.030	96.475	

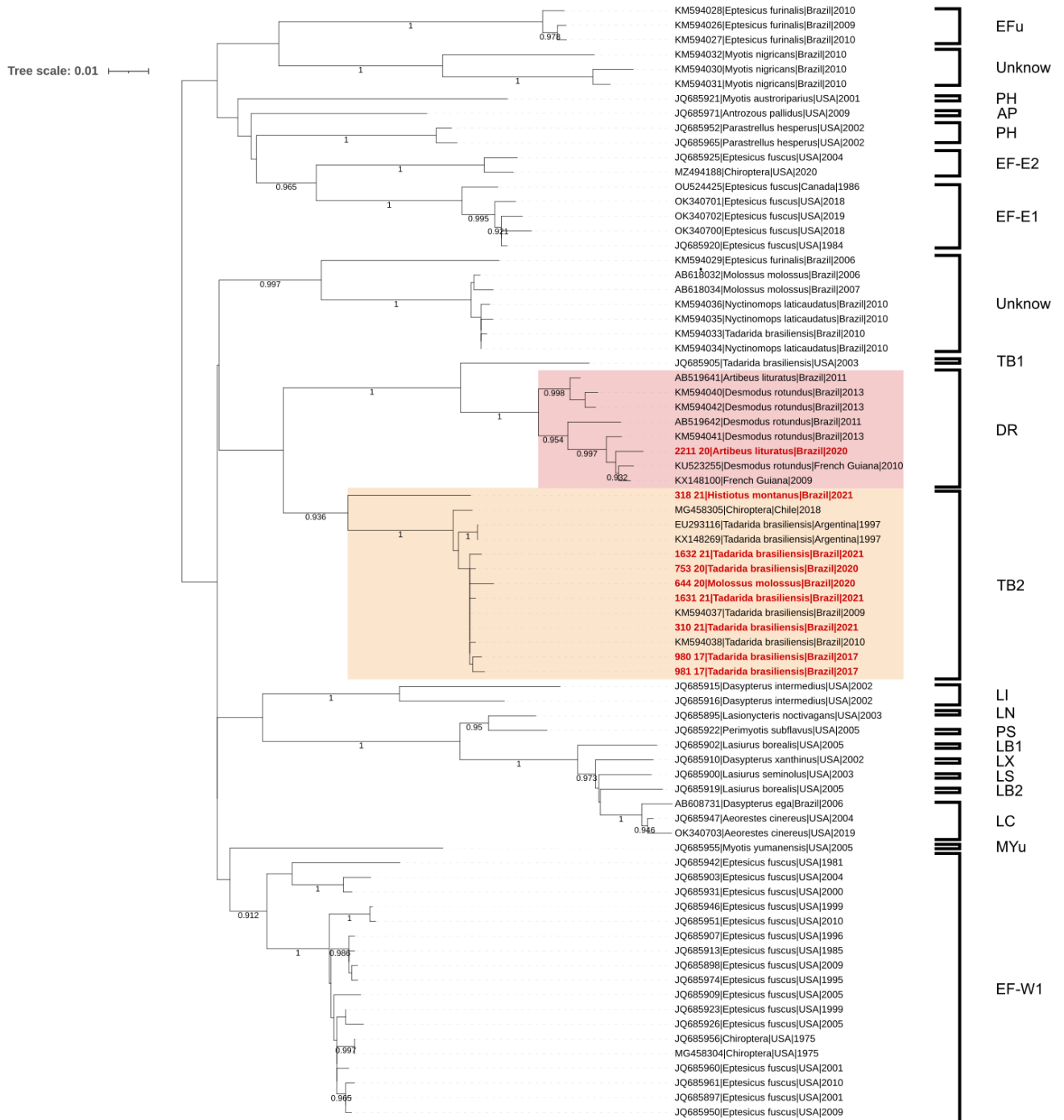
**Quadro 12** - Matriz de distância da identidade de nucleotídeos nos genes G e L, em estilo de números e mapa de calor

Amostra	310_21	753_20	1631_21	980_17	981_17	1548_21	1632_21	644_20	318_21	460_21	805_20	2211_20
310_21 Tadarida		99.522	99.475	99.192	99.133	94.683	99.221	98.944	83.234	73.525	72.535	67.615
753_20 Tadarida	99.522		99.522	99.239	99.180	94.730	99.280	98.980	83.175	73.549	72.653	67.662
1631_21 Tadarida	99.475	99.522		99.221	99.162	94.692	99.260	98.956	83.149	73.637	72.552	67.633
980_17 Tadarida	99.192	99.239	99.221		99.564	95.063	99.357	99.027	83.098	73.525	72.579	67.654
981_17 Tadarida	99.133	99.180	99.162	99.564		95.181	99.322	98.991	83.004	73.490	72.485	67.583
1548_21 Tadarida	94.683	94.730	94.692	95.063	95.181		94.815	94.553	80.718	69.635	68.690	63.938
1632_21 Tadarida	99.221	99.280	99.260	99.357	99.322	94.815		99.068	83.092	73.522	72.617	67.601
644_20  <i>Molossus</i>	98.944	98.980	98.956	99.027	98.991	94.553	99.068		83.022	73.472	72.541	67.571
318_21  <i>Histiopus</i>	83.234	83.175	83.149	83.098	83.004	80.718	83.092	83.022		67.397	65.735	60.555
460_21  <i>Myotis</i>	73.525	73.549	73.637	73.525	73.490	69.635	73.522	73.472	67.397		59.206	58.898
805_20  <i>Eptesicus</i>	72.535	72.653	72.552	72.579	72.485	68.690	72.617	72.541	65.735	59.206		58.976
2211_20  <i>Artibeus</i>	67.615	67.662	67.633	67.654	67.583	63.938	67.601	67.571	60.555	58.898	58.976	

**Quadro 13** - Matriz de distância da identidade de aminoácidos nos genes G e L, em estilo de números e mapa de calor

Amostra	310_21	753_20	980_17	981_17	1632_21	1548_21	318_21	2211_20	460_21	644_20	1631_21	805_20
310_21 Tadarida		98.771	98.240	98.098	98.346	92.307	73.138	52.051	17.251	31.982	23.724	22.531
753_20 Tadarida	98.771		98.204	98.063	98.346	92.272	72.961	52.122	17.283	32.079	23.788	22.628
980_17 Tadarida	98.240	98.204		99.009	98.626	93.010	72.880	52.113	17.370	32.072	23.749	22.651
981_17 Tadarida	98.098	98.063	99.009		98.484	93.329	72.703	51.973	17.308	32.039	23.717	22.717
1632_21 Tadarida	98.346	98.346	98.626	98.484		92.589	72.887	52.117	17.248	31.946	23.626	22.628
1548_21 Tadarida	92.307	92.272	93.010	93.329	92.589		70.027	47.448	14.949	29.576	21.322	20.250
318_21  <i>Histiopus</i>	73.138	72.961	72.880	72.703	72.887	70.027		42.742	13.959	25.223	18.971	17.842
2211_20  <i>Artibeus</i>	52.051	52.122	52.113	51.973	52.117	47.448	42.742		13.177	17.890	16.496	16.419
460_21  <i>Myotis</i>	17.251	17.283	17.370	17.308	17.248	14.949	13.959	13.177		58.178	58.903	13.997
644_20  <i>Molossus</i>	31.982	32.079	32.072	32.039	31.946	29.576	25.223	17.890	58.178		87.835	21.719
1631_21 Tadarida	23.724	23.788	23.749	23.717	23.626	21.322	18.971	16.496	58.903	87.835		18.641
805_20  <i>Eptesicus</i>	22.531	22.628	22.651	22.717	22.628	20.250	17.842	16.419	13.997	21.719	18.641	

**Figura 10** - Filogenia por máxima verossimilhança (ML) de 76 sequências completas do gene N de RABVs de morcegos coletados no continente americano, incluindo 09 sequências deste estudo (grifadas em vermelho). Os clados menores TB2 e DR estão em destaque. Os valores numéricos representam 1.000 replicações de bootstrap. A árvore foi enraizada pelo ponto médio.









## 5.6 Discussão

O objetivo do presente estudo foi utilizar a vigilância genômica na rotina de controle da raiva, analisando por sequenciamento de alto desempenho amostras de RABV obtidas de animais silvestres, coletadas pelo Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva (PECPR) do Rio Grande do Sul.

Como já era esperado, durante o período analisado, as únicas amostras de animais silvestres positivas para raiva foram de morcegos. Ao se analisar os municípios onde ocorreram as coletas (Figura 9), é possível perceber que a maioria deles se localiza mais próximo à costa do estado. Ainda que esse dado seja influenciado pelo esforço de coleta da equipe local de vigilância, a ocorrência frequente de morcegos insetívoros positivos para raiva em cidades do litoral sul do estado é considerada pelo PECPR como um ciclo enzoótico desta região (CAMPOS *et al.*, 2018; CEVS CENTRO ESTADUAL DE VIGILANCIA EM SAUDE, 2021). Das 17 amostras analisadas, 11 pertencem ao litoral sul.

A análise de filogenia automatizada demonstrou a circulação simultânea de pelo menos 04 linhagens distintas de RABV em morcegos do Rio Grande do Sul. Porém, a topologia assumida nas árvores das análises de gene individual (N) e genes concatenados (G e L), e as matrizes de distância da identidade nucleotídica e da identidade de aminoácidos na abordagem de análise pelo gene N (Quadros 10 e 11), sugerem que a amostra 318\_21, coletada a partir de um morcego *Histiotus sp.*, trata-se de uma linhagem distinta das demais do clado TB2, o que eleva para 05 o número de linhagens de RABV identificadas nos morcegos amostrados.

Nas árvores geradas a partir dos genes G e L concatenados, as sequências redundantes à filogenia da N apresentaram uma topologia parecida, agrupando nos mesmos clados menores, mas com padrões distintos entre as duas abordagens. Em ambas o clado menor TB2, formado por morcegos insetívoros (AgV4), e o clado DR, formado por morcegos hematófagos e frugívoros (AgV3), demonstram derivar de uma ancestralidade em comum.

Na filogenia do gene N, em todas as amostras a identidade de aminoácidos foi superior a de nucleotídeos, indicando o predomínio das substituições sinônimas. Essa mesma relação não foi observada na filogenia dos genes G e L concatenados. Neste caso, todas as amostras demonstraram maior identidade nucleotídica em comparação à de aminoácidos. Essa

heterogeneidade nos padrões de identidade está relacionada às diferentes funções das proteínas codificadas por esses genes e a pressão seletiva sofrida durante processo evolutivo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). O gene N é o mais conservado e com alto valor preditivo para uma classificação inicial das distintas linhagens genéticas do RABV, sendo que isolados com identidade nucleotídica menor que 80%, ou abaixo de 92% na identidade de aminoácidos, pertencem a diferentes genótipos (KISSI; TORDO; BOURHY, 1995). A glicoproteína (G) constitui a única proteína na superfície externa do vírion, que interage com o receptor das células e promove a entrada do vírus por fusão de membrana. É também o alvo primário para os anticorpos neutralizantes de vírus e possui sítios de aminoácidos importantes para patogenicidade do vírus (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; LUO *et al.*, 2020). Por essas características, a G possui a maior taxa de mutação depois da fosfoproteína (P) e a taxa de substituições não sinônimas é quase o dobro do encontrado na N (HOLMES *et al.*, 2002). Neste trabalho, optou-se por analisar não somente sequências de nucleotídeos ou aminoácidos individuais, mas também de sequências concatenadas, pois essas permitem comparar as diferentes pressões seletivas sofridas, melhorando a compreensão dos eventos de troca de hospedeiros (FISCHER *et al.*, 2018; JOHNSON *et al.*, 2002). Ampliar o conjunto de dados analisados, preferencialmente utilizando genomas completos e metadados detalhados, aumenta a robustez da análise e as possibilidades de classificação dos diferentes genótipos (BRUNKER *et al.*, 2020).

A heterogeneidade das linhagens de RABV associadas a espécies específicas de mamíferos, incluindo os morcegos, já é consenso no conhecimento sobre a raiva (E. ESCOBAR *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VELASCO-VILLA *et al.*, 2002). Apesar do RABV poder infectar supostamente todos os mamíferos, evidências mostram que o vírus deve antes se adaptar para então se estabelecer em um ciclo sustentado em uma nova espécie de hospedeiro (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; MARSTON *et al.*, 2018; NITSCHERL *et al.*, 2021). Por exemplo, as diferenças estruturais apresentadas no receptor celular de cada espécie ou gênero de hospedeiro podem exercer efeito seletivo para glicoproteína das diferentes linhagens de RABV, favorecendo o aparecimento de ciclos específicos, independentes e adaptados a determinados hospedeiros (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Duas linhagens distintas são associadas a *T. brasiliensis*, a TB1, do hemisfério norte e a TB2 do hemisfério sul. O ciclo epidemiológico do RABV mantido em *T. brasiliensis* da

Argentina, Chile, Uruguai e Brasil já foi reportado em diferentes estudos (ESCOBAR *et al.*, 2013; FAVORETTO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PIÑERO *et al.*, 2012), mas pouco se sabe sobre os mecanismos de manutenção e dispersão do RABV nesses animais que formam colônias que chegam a dez milhões de indivíduos (GAMBOA ALURRALDE; BARQUEZ; DÍAZ, 2017). Há relato da transmissão vertical do RABV nessa espécie do hemisfério norte (STEECE; CALISHER, 1989), onde os padrões de migração são mais conhecidos (MCCRACKEN *et al.*, 2016). Já no hemisfério sul, o conhecimento sobre os eventos de migração permanece limitado (BOERO *et al.*, 2020; NUÑEZ *et al.*, 2018). No Rio Grande do Sul a oscilação no número de indivíduos das colônias confirma a existência do movimento migratório, mas ele ocorre de maneira não uniforme e não é notado em todas as regiões (RIO GRANDE DO SUL. CEVS SES RS, 2018). As amostras de RABV da espécie *T. brasiliensis* coletadas ao longo dos anos de 2017, 2020 e 2021, apresentaram identidade nucleotídica próxima a 100% entre si, sugerindo não tratar-se de múltiplas introduções seguidas de extinção, e sim de um ciclo enzoótico estabelecido, conforme considerado pela vigilância. Apesar da permanência do vírus no estado, nas últimas duas décadas os casos em outras espécies de mamíferos associados à linhagem TB2 se limitaram a 01 cão e 03 gatos, três desses casos na região do litoral sul (CEVS SES, 2021). Dada a especificidade deste genótipo quanto ao hospedeiro, é improvável que esta linhagem de TB2 seja capaz de iniciar um ciclo epidêmico sustentado em cães e gatos, limitando-se a casos incidentais em episódios autolimitados, diferentemente por exemplo do RABV associado ao ciclo enzoótico dos *Eptesicus* da América do Norte (EF-W1), envolvido em múltiplas introduções em carnívoros sob a forma de repetidos surtos independentes em gambás e raposas (KUZMIN *et al.*, 2012). Não obstante, as amostras de RABVs TB2 deste estudo apresentaram >99% de identidade com a sequência parcial da nucleoproteína do único caso de raiva humana atribuída ao RABV de *T. brasiliensis*, ocorrido no Chile em 1996 (FAVI *et al.*, 2002). Este fato indica que ainda que não tenham sido relatados casos humanos atribuído a esta linhagem no Brasil, e apesar dos casos em cães e gatos no Rio Grande do Sul serem limitados (BATISTA *et al.*, 2009; CEVS SES, 2021), o vírus tem capacidade de eventualmente realizar a troca de hospedeiro (*spillover*) para humanos, não devendo este risco ser, em hipótese alguma, negligenciado.

A amostra coletada a partir de um morcego frugívoro da espécie *Artibeus lituratus* (2211\_20) confirma a crescente importância que esta espécie de morcegos vem apresentando na epidemiologia da raiva (CARNEIRO *et al.*, 2009; FAHL, 2009). A ocorrência de *A. lituratus* com RABV de morcegos hematófagos (clado DR) tem sido relatada com frequência em cidades do Brasil (FAHL, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2007). Esses morcegos são considerados animais que toleram bem ambientes degradados, com grande plasticidade dos hábitos alimentares e facilidade de se adaptar a novos tipos de abrigos, o que faz desta a espécie frugívora mais abundante em ambientes urbanos (FAUSTINO *et al.*, 2021) e aumenta o interesse em seu monitoramento na prevenção da raiva humana. Apesar de agrupar em um clado coerente, dentre as amostras analisadas na filogenia por genes concatenados, a amostra 2211 foi a com pior cobertura das proteínas G (57,6%) e L (76,4%), o que compromete a análise de sua identidade, principalmente de aminoácidos, com as demais.

O fato da espécie *T. brasiliensis* ser a mais frequente nos morcegos enviados para diagnóstico da raiva no Rio Grande do Sul influenciou na escolha das sequências que serviram de referência na elaboração dos *primers*. A seletividade dos *primers* provavelmente contribuiu para a baixa cobertura e/ou ausência de amplificação de algumas regiões de RABVs relacionados a outras espécies de morcegos no sequenciamento por nanoporos, não contemplando a diversidade das amostras analisadas. A ampla gama de espécies de morcegos que hospedam distintos RABVs é, portanto, um desafio para este tipo de vigilância. Espera-se que, com o aumento na disponibilidade de genomas completos de morcegos, a diversidade das possíveis espécies hospedeiras possa ser melhor trabalhada (AL-EITAN *et al.*, 2021; HYEON *et al.*, 2021; RODRÍGUEZ; LEÓN; CARVAJAL, 2022). A utilização de *primers* fracionados em *pools* por segmentos do genoma, permitindo a intercambialidade, também pode ser uma estratégia a ser adotada para transpor esta questão no sequenciamento por nanoporos.

Outro ponto de estrangulamento para a ampla utilização da genômica na vigilância é a necessidade de conhecimentos básicos de bioinformática e filogenia para manuseio e interpretação dos resultados. Para que os profissionais da vigilância acompanhem a dinâmica do vírus, os produtos de sequenciamento devem ser seguidamente revisitados e analisados junto a novas sequências, sob um contexto epidemiológico. O amplo uso da genômica na pandemia de COVID19, seguida da ampliação da oferta de sites automatizados de análise online, tem

auxiliado os profissionais de saúde pública a superar esta barreira (CLEEMPUT *et al.*, 2020). Por este motivo, optou-se aqui apenas por ferramentas *online* de análises automatizadas, de fácil execução e uso aberto.

A identificação das espécies de hospedeiro apenas pela análise morfológica é uma fragilidade deste trabalho, dificultando a elaboração do raciocínio epidemiológico sob o ponto de vista da biologia do hospedeiro. Esta limitação pode ser resolvida através da incorporação da análise do DNA mitocondrial por sequenciamento parcial do gene citocromo oxidase I (COI) (CARNIELLI JR *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que a adoção de métodos moleculares não é condição para a implementação de um programa de controle da raiva atuante. Mas eles são imprescindíveis para entender e caracterizar a diversidade circulante de RABV no território de atuação. O uso da genômica na rotina diagnóstica do controle da raiva possibilita a geração de dados e informações que vão muito além da caracterização molecular da linhagem do vírus rábico encontrado. O sequenciamento pode preencher lacunas críticas de conhecimento e esclarecer incertezas sobre a dinâmica vírus-hospedeiro e seus processos espaço-temporais, auxiliando no direcionamento das ações preventivas. Por exemplo, a confirmação de um ciclo enzoótico estabelecido e perene em morcegos no litoral sul pode dar ensejo a uma abordagem de vigilância direcionada a este panorama, promovendo campanhas de vacinação direcionadas, principalmente em cães e gatos que frequentam a rua, e que estão mais expostos ao risco de infecção (ARAÚJO *et al.*, 2020; GENARO, 2010). A vigilância genômica continuada permitirá o acompanhamento das relações filogenéticas entre os diferentes RABVs encontrados no estado e o conhecimento das alterações genéticas das linhagens circulantes, documentando a evolução viral ao longo do tempo, servindo também como fonte de informação para futuros estudos evolutivos do vírus rábico. Nesta abordagem longitudinal de vigilância, fora de uma situação de surto ou epidemia, o uso da genômica não tem o objetivo de determinar as ações que devem ser executadas, como bloqueio focal por exemplo. Este tipo de diagnóstico pode ser realizado através de ensaios moleculares mais simples e rápidos, como o RT-PCR. Em um contexto prospectivo de vigilância, análises genômicas podem ser feitas de forma eletiva, ao final de cada sazonalidade ou em outro momento mais oportuno, otimizando recursos e mão de obra para o momento que o laboratório esteja menos demandado. Concluindo, a incorporação da genômica na vigilância abre um novo capítulo

no conhecimento sobre o RABV, aumentando o detalhamento das análises e ampliando as possibilidades de novas abordagens na prevenção da raiva.

## **6 CONCLUSÃO**

A utilização de condutas integradas na prevenção da raiva, combinando os dados assistenciais e abordagens direcionadas de vigilância, tais como o inquérito sorológico em silvestres, somado a ações de precisão tais como a vigilância genômica, produz informações que instrumentalizam o setor saúde para a qualificação do atendimento antirrábico e para o direcionamento dos esforços de controle da raiva no Rio Grande do Sul.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, A. A. V. *et al.* **Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry**. *Viruses*, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 117–139, 2012.
- ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. **Rabies Virus Transcription and Replication**. In: *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. [S. l.]: Elsevier, 2011. v. 79, p. 1–22. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123870407000019>. Acesso em: 10 ago. 2020.
- AL-EITAN, L. N. *et al.* **Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of rabies viruses from Jordan**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 15, n. 5, p. e0009431, 2021.
- ANDRADE, B. F. M. da C. **Atendimento antirrábico humano pós-exposição no estado de São Paulo: perfil epidemiológico e avaliação de conduta**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/202849>. Acesso em: 28 jan. 2022.
- ARAÚJO, I. L. *et al.* **Análise epidemiológica dos atendimentos da profilaxia antirrábica humana associados a acidentes com gatos**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, [s. l.], v. 72, p. 814–822, 2020.
- BATISTA, H. *et al.* **Antigenic and Genetic Stability of Rabies Virus**. *Donnish Journal of General and Molecular Virology*, [s. l.], v. 01, p. 01–04, 2015.
- BATISTA, H. B. de C. R. *et al.* **Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant**. *Acta Scientiae Veterinariae*, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 371–374, 2009.
- BENAVIDES, J. A. *et al.* **An evaluation of Brazil’s surveillance and prophylaxis of canine rabies between 2008 and 2017**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0007564, 2019.
- BENAVIDES, J. A. *et al.* **Defining New Pathways to Manage the Ongoing Emergence of Bat Rabies in Latin America**. *Viruses*, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1002, 2020a.
- BENAVIDES, J. A. *et al.* **Using Surveillance of Animal Bite Patients to Decipher Potential Risks of Rabies Exposure From Domestic Animals and Wildlife in Brazil**. *Frontiers in Public*

Health, [s. l.], v. 8, p. 318, 2020b.

BIOMATTERS INC. **Geneious Prime 2022.0.1**. [S. l.], 2022. Disponível em: <http://www.geneious.com/> .

BOERO, L. *et al.* **Monitoring and Characterizing Temporal Patterns of a Large Colony of *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera: Molossidae) in Argentina Using Field Observations and the Weather Radar RMA1**. Remote Sensing, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 210, 2020.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. **Molecular Diversity of the Lyssavirus Genus**. Virology, [s. l.], v. 194, n. 1, p. 70–81, 1993.

BROCK FENTON, M. *et al.* **Knowledge gaps about rabies transmission from vampire bats to humans**. Nature Ecology & Evolution, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 517–518, 2020.

BRUNKER, K. *et al.* **Rapid in-country sequencing of whole virus genomes to inform rabies elimination programmes**. Wellcome Open Research, [s. l.], v. 5, p. 3, 2020.

CAMPOS, A. A. S. *et al.* **Raiva em Colônias de Morcegos Insetívoros no Litoral do Rio Grande do Sul**. Boletim Epidemiológico CEVS RS, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 2, 2018. Disponível em : <https://www.cevs.rs.gov.br/boletim-epidemiologico>

CARNEIRO, N. F. de F. *et al.* **Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [s. l.], v. 42, p. 449–451, 2009.

CARNIELLI JR, P. *et al.* **Identification of Different Species of Mammalians Involved in Zoonoses as Reservoirs or Hosts by Sequencing of the Mitochondrial DNA Cytochrome B Gene**. Annual Research & Review in Biology, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2016.

CEVS CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PECPR - **Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva RS. Rio Grande do Sul**. Brasil: CEVS - Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, 2021. Disponível em: <https://cevs.rs.gov.br/raiva> .

CHAVES, L. B. *et al.* **Monoclonal antibodies for characterization of rabies virus isolated from non-hematophagous bats in Brazil**. The Journal of Infection in Developing Countries, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1238–1249, 2015.

CHAVES, L. B. **Produção de anticorpos monoclonais para caracterização de variantes**

**antigênicas brasileiras de vírus da raiva.** 2010. Doutorado em Biotecnologia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-19082010-165840/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

CLEEMPUT, S. *et al.* **Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes.** *Bioinformatics*, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 3552–3555, 2020.

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

CRISCUOLO, A.; GRIBALDO, S. **BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments.** *BMC Evolutionary Biology*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 210, 2010.

DATABASE RESOURCES OF NCBI. **THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 44, n. Database issue, p. D7–D19, 2016.

DE BENEDICTIS, P. *et al.* **Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis.** *EMBO Molecular Medicine*, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 407–421, 2016.

DEREEPER, A. *et al.* **Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.** *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 36, n. Web Server issue, p. W465-469, 2008.

DIEDRICH, G.; PREDEBON, J.; PRATO, R. **Programa Estadual de Controle e Profilaxia da Raiva: um Breve Histórico.** *Boletim Epidemiológico CEVS RS*, [s. l.], v. 15, n. 01, p. 16, 2013. Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/boletim-epidemiologico>

E. ESCOBAR, L. *et al.* **Bat-Borne Rabies In Latin America.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 63–72, 2015.

ESCOBAR, L. E. *et al.* **Ecology and Geography of Transmission of Two Bat-Borne Rabies Lineages in Chile.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 7, n. 12, p. e2577, 2013.

FAHL, W. de O. **Filogenia de vírus da raiva isolados de morcegos frugívoros do gênero**

**Artibeus e relacionados a morcegos hematófagos com base nos genes codificadores da nucleoproteína N e glicoproteína G.** 2009. Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-18022010-092648/>. Acesso em: 10 ago. 2020.

FANTINI, D. C. *et al.* **Perfil epidemiológico da febre amarela da região Sul do Brasil, de 2007 a 2019 / Epidemiological profile of yellow fever of Southern Brazil, from 2007 to 2019.** Brazilian Journal of Health Review, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 891–907, 2021.

FAUSTINO, C. de L. *et al.* **Frugivorous bat (Chiroptera: Phyllostomidae) community structure and trophic relations in Atlantic Forest fragments.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, [s. l.], v. 43, p. e52030–e52030, 2021.

FAVI, M. *et al.* **First Case of Human Rabies in Chile Caused by an Insectivorous Bat Virus Variant.** Emerging Infectious Diseases, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 79–81, 2002.

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 São Paulo, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 91–95, 2002.

FAVORETTO, S. *et al.* **Rabies Virus Maintained by Dogs in Humans and Terrestrial Wildlife, Ceara State, Brazil.** Emerging Infectious Diseases, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1978–1981, 2006.

FISCHER, S. *et al.* **Defining objective clusters for rabies virus sequences using affinity propagation clustering.** PLOS Neglected Tropical Diseases, [s. l.], v. 12, n. 1, p. e0006182, 2018.

FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. **The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers.** Nature Reviews Microbiology, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 241–255, 2018.

FOOKS, A. R. *et al.* **Renewed Public Health Threat from Emerging Lyssaviruses.** Viruses, [s. l.], v13, p. 10, 2021.

FREIRE DE CARVALHO, M. *et al.* **Rabies in the Americas: 1998-2014.** PLOS Neglected Tropical Diseases, [s. l.], v. 12, n. 3, p. e0006271, 2018.

GAMBOA ALURRALDE, S.; BARQUEZ, R. M.; DÍAZ, M. M. **New records of bats (Mammalia: Chiroptera) for a southern locality of the Argentine Yungas**. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/127734>. Acesso em: 22 jan. 2022.

GENARO, G. **Gato doméstico: futuro desafio para controle da raiva em áreas urbanas?**. Pesquisa Veterinária Brasileira, [s. l.], v. 30, p. 186–189, 2010.

GUINDON, S. *et al.* **New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0**. Systematic Biology, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

HAMPSON, K. *et al.* **Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies**. PLOS Neglected Tropical Diseases, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e0003709, 2015.

HOLMES, E. C. *et al.* **Genetic Constraints and the Adaptive Evolution of Rabies Virus in Nature**. Virology, [s. l.], v. 292, n. 2, p. 247–257, 2002.

HORTON, D. L. *et al.* **Antigenic and genetic characterization of a divergent African virus, Ikoma lyssavirus**. The Journal of General Virology, [s. l.], v. 95, n. Pt 5, p. 1025–1032, 2014.

HYEON, J.-Y. *et al.* **Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of Rabies Viruses from Bats in Connecticut, USA, 2018 & 2019**. Viruses, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2500, 2021.

IBGE, BRASIL. **Retroprojeção da População do Rio Grande do Sul. Brasil**: IBGE Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica., 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/pesquisa/10086/76551?ano=2009>. Acesso em: 16 set. 2021.

JOHNSON, N. *et al.* **Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes**. Archives of Virology, [s. l.], v. 147, n. 11, p. 2111–2123, 2002.

JOHNSON, S. S. *et al.* **Real-Time DNA Sequencing in the Antarctic Dry Valleys Using the Oxford Nanopore Sequencer**. Journal of Biomolecular Techniques : JBT, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 2–7, 2017.

JORGE, R. S. P. *et al.* **Detection of rabies virus antibodies in brazilian free-ranging wild carnivores**. Journal of Wildlife Diseases, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 1310–1315, 2010.

JUNIER, T.; ZDOBNOV, E. M. **The Newick utilities: high-throughput phylogenetic tree processing in the UNIX shell.** *Bioinformatics*, [s. l.], v. 26, n. 13, p. 1669–1670, 2010.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. **MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.** *Molecular Biology and Evolution*, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KESSELS, J. A. *et al.* **Pre-exposure rabies prophylaxis: a systematic review.** *Bulletin of the World Health Organization*, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 210-219C, 2017.

KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. **Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene.** *Virology*, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 526–537, 1995.

KOBAYASHI, Y. *et al.* **Genetic diversity of bat rabies viruses in Brazil.** *Archives of Virology*, [s. l.], v. 152, n. 11, p. 1995–2004, 2007.

KUMAR, S. *et al.* **MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.** *Molecular Biology and Evolution*, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

KUZMIN, I. V. *et al.* **Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009.** *PLOS Pathogens*, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e1002786, 2012.

LEMOINE, F. *et al.* **NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists.** *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W260–W265, 2019.

LETUNIC, I.; BORK, P. **Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation.** *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 49, n. W1, p. W293–W296, 2021.

LUO, J. *et al.* **Single amino acid change at position 255 in rabies virus glycoprotein decreases viral pathogenicity.** *The FASEB Journal*, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 9650–9663, 2020.

MARSTON, D. A. *et al.* **Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G–L 3' non-translated region.** *Journal of General Virology*, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1302–1314, 2007.

MARSTON, D. A. *et al.* **The lyssavirus host-specificity conundrum — rabies virus — the**

**exception not the rule.** *Current Opinion in Virology*, [s. l.], v. 28, p. 68–73, 2018.

MCCRACKEN, G. F. *et al.* **Airplane tracking documents the fastest flight speeds recorded for bats.** *Royal Society Open Science*, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 160398, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva.** [s. l.], p. 108, 2008.  
Disponível em :  
[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_laboratorial\\_raiva.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_raiva.pdf)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde de A a Z - Raiva.** Disponível em:  
<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva>. Acesso em: 7 jan. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde.** [s. l.], 5ª ed, 2021. Disponível em:  
[https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude\\_5ed\\_21nov21\\_isbn5.pdf/@@download/file/Guia%20de%20Vigil%C3%A2ncia%20em%20Sa%C3%BAde\\_5ed\\_21nov21\\_isbn5.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude_5ed_21nov21_isbn5.pdf/@@download/file/Guia%20de%20Vigil%C3%A2ncia%20em%20Sa%C3%BAde_5ed_21nov21_isbn5.pdf)

NADIN-DAVIS, S. A. *et al.* **Application of high-throughput sequencing to whole rabies viral genome characterisation and its use for phylogenetic re-evaluation of a raccoon strain incursion into the province of Ontario.** *Virus Research*, [s. l.], v. 232, p. 123–133, 2017.

NAGASHIMA, J. B.; SONGSASEN, N. **Canid reproductive biology: norm and unique aspects in strategies and mechanisms.** *Animals*, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 653, 2021.

NASCIMENTO, A. O. do *et al.* **Epidemiological profile of human antirabic care in a planning area of the city of Rio de Janeiro.** *Revista Mineira de Enfermagem*, [s. l.], v. 23, p. e-1216, 2019.

NITSCHER, S. *et al.* **Point mutations in the glycoprotein ectodomain of field rabies viruses mediate cell culture adaptation through improved virus release in a host cell dependent and independent manner.** *Viruses*, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1989, 2021.

NUÑEZ, G. B. *et al.* **Circannual sex distribution of the brazilian free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis* (chiroptera: *Molossidae*), suggests migration in colonies from Uruguay.** *Mastozoología Neotropical*, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 213–219, 2018.

OLIVEIRA, R. N. *et al.* **Rabies virus diversification in aerial and terrestrial mammals.** *Genetics and Molecular Biology*, [s. l.], v. 43, n. 3, p. e20190370, 2020.

OLIVEIRA, R. de N. *et al.* **Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology.** *Virology*, [s. l.], v. 405, n. 2, p. 352–360, 2010.

PIÑERO, C. *et al.* **High diversity of rabies viruses associated with insectivorous bats in argentina: presence of several independent enzootics.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e1635, 2012.

QUICK, J. *et al.* **Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples.** *Nature protocols*, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1261–1276, 2017.

RIO GRANDE DO SUL. CEVS SES RS. **Guia de manejo e controle de morcegos.** [s. l.], p. 142, 2018. Disponível em:  
<https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201909/24093745-2018-guia-morcegos.pdf>

RODRÍGUEZ, L. C.; LEÓN, B.; CARVAJAL, L. R. **Phylogenetic relationships of a rabies virus isolate in Costa Rica.** *UNED Research Journal*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e3713–e3713, 2022.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; BERNADETTE ABELA-RIDDER. **Laboratory techniques in rabies.** Fifth edition. Geneva, Switzerland: [s. n.], 2018. v. 01

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. **Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies.** *F1000Research*, [s. l.], v. 6, p. 184, 2017.

RUPPRECHT, C. E.; SALAHUDDIN, N. **Current status of human rabies prevention: remaining barriers to global biologics accessibility and disease elimination.** *Expert Review of Vaccines*, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 629–640, 2019.

SCHATZ, J. *et al.* **Twenty years of active bat rabies surveillance in Germany: a detailed analysis and future perspectives.** *Epidemiology and Infection*, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 1155–1166, 2014.

SEAPDR. **Programa Estadual da Raiva em Herbívoros.** Rio Grande do Sul, Brasil: SEAPDR - Secretaria Estadual da Agricultura do Rio Grande do Sul, 2019. Disponível em:  
<https://www.agricultura.rs.gov.br/pncrh-rs>. Acesso em: 16 set. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico SVS Vol.51 n 35.**



Brasil: Ministério da Saúde, 2020. Boletim Epidemiológico. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/813/version/858>. Acesso em: 6 set. 2020.

STEECE, R. S.; CALISHER, C. H. **Evidence for prenatal transfer of rabies virus in the mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*)**. *Journal of Wildlife Diseases*, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 329–334, 1989.

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

VELASCO-VILLA, A. *et al.* **Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in Mexico**. *Journal of Clinical Microbiology*, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 951–958, 2002.

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

WALKER, P. J. *et al.* **ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae**. *Journal of General Virology*, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 447–448, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (org.). **WHO Expert Consultation on Rabies: third report**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2018. (WHO technical report series, v. 1012).