

## **Epidemiologia e caracterização antigênica e genética de casos de raiva animal no estado do Pará, Amazônia Brasileira**

**Epidemiology, antigenic and genetic characterization of animal rabies cases in Pará state, Brazilian Amazon**

**Epidemiología y caracterización antigénica y genética de casos de rabia animal en el estado de Pará, Amazonia brasileña**

Recebido: 19/05/2022 | Revisado: 26/05/2022 | Aceito: 22/05/2022 | Publicado: 28/05/2022

### **Taiana Andrade Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5924-1832>  
Universidade do Estado do Pará, Brasil  
E-mail: taiana.freitas@hotmail.com

### **Érika Dayane Leal Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9850-8563>  
Instituto Evandro Chagas, Brasil  
E-mail: erika\_dayane.lr@hotmail.com

### **Fernanda Monik Silva Martins**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4161-0027>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: fernanda.martins.ufra@gmail.com

### **André Luis de Sousa Nogueira Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2810-7259>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: andrelnlima@gmail.com

### **Samir Mansour Moraes Casseb**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7419-3381>  
Universidade Federal do Pará, Brasil  
E-mail: samir.casseb@gmail.com

### **Sandro Patroca da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7185-4538>  
Instituto Evandro Chagas, Brasil  
E-mail: spatroca@gmail.com

### **Alexandre do Rosário Casseb**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5615-2423>  
Universidade Federal Rural da Amazônia, Brasil  
E-mail: alexcasseb@yahoo.com.br

### **Pedro Fernando da Costa Vasconcelos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6603-5527>  
Universidade do Estado do Pará, Brasil  
E-mail: pedrofc.vasconcelos@gmail.com

### **Elizabeth Salbê Travassos da Rosa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9707-3940>  
Instituto Evandro Chagas, Brasil  
E-mail: elizabethsalbe@iec.gov.br

### **Livia Medeiros Neves Casseb**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8578-9984>  
Instituto Evandro Chagas, Brasil  
E-mail: liviacasseb@iec.pa.gov.br

## **Resumo**

Caracterizar antigênica e geneticamente variantes do *Rabies lyssavirus*, isoladas no Laboratório de diagnóstico da Raiva do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará, Brasil), bem como verificar a distribuição geográfica das amostras positivas, de acordo com as mesorregiões do estado, a partir de amostras oriundas do estado do Pará, recebidas no período de 2010 a 2017. As amostras positivas foram caracterizadas antigênicamente pelo painel de anticorpos monoclonais (MAb), e quando não havia compatibilidade com o painel de MAb, as amostras eram caracterizadas geneticamente, de acordo com a metodologia de Barbosa e colaboradores. As 73 amostras positivas foram submetidas à caracterização antigênica, das quais 72,60% eram compatíveis com algum padrão de leitura do painel de MAb; 63,01% eram compatíveis com a AgV 3; 9,59% eram compatíveis com a AgV 2 e 27,40% não corresponderam a nenhum padrão de leitura e foram encaminhadas para o sequenciamento genético. Todas as 20

amostras submetidas ao sequenciamento parcial do gene N foram agrupadas no grupo da AgV 3, com valor de *bootstrap* de 99%. No estado do Pará, foi observada uma mudança no ciclo epidemiológico da raiva, por conseguinte, a AgV 3, associada ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*, foi amplamente identificada. Esses dados diferem dos encontrados em outras décadas, nas quais a AgV 2 era predominante. Esta mudança é possivelmente um resultado das campanhas de vacinação em massa. Também foi possível observar que a distribuição temporal da raiva no estado sugere possíveis falhas nas ações de controle e prevenção da doença.

**Palavras-chave:** Vírus da raiva; Diagnóstico; Vigilância Epidemiológica.

### Abstract

Antigenic and genetic characterization of *Rabies lyssavirus* (RABV) variants isolated in the Rabies Diagnostic Laboratory of Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará, Brazil), as well as verifying the geographic distribution of positive samples, according to the mesoregions of the state, from samples from the state of Pará received in the period 2010 to 2017. Positive samples were antigenically characterized by the monoclonal antibody panel (MAb) provided by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and when there was no compatibility with the MAb panel, the samples were genetically characterized according to the Barbosa methodology and collaborators. The 73 positive samples were submitted to antigenic characterization, of which 72.60% were compatible with some reading pattern of the MAb panel; 63.01% were compatible with AgV 3; 9.59% were compatible with AgV 2 and 27.40% did not match any reading pattern and were forwarded to genetic sequencing. All 20 samples submitted to partial N gene sequencing were grouped into the AgV 3 group, with a bootstrap value of 99%. In the state of Pará, a change in the epidemiological cycle of rabies was observed, therefore, the AgV 3, associated with the hematophagous bat *Desmodus rotundus*, was widely identified. These data differ from those found in other decades, in which AgV 2 was predominant, this change is possibly a result of mass vaccination campaigns. It was also possible to observe that the temporal distribution of rabies in the state suggests possible failures in disease control and prevention actions.

**Keywords:** Rabies virus, Diagnosis; Epidemiological Surveillance.

### Resumen

Caracterizar antigénica y genéticamente variantes del *Rabies lyssavirus* (RABV) aisladas en el Laboratorio de Diagnóstico de Rabia del Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará, Brasil), así como verificar la distribución geográfica de muestras positivas, según las mesorregiones del estado, de muestras del estado de Pará, recibidas en el período de 2010 a 2017. Las muestras positivas fueron caracterizadas antigénicamente por el panel de anticuerpos monoclonales (MAb), y cuando no hubo compatibilidad con el panel de MAb, las muestras fueron caracterizadas genéticamente, según la metodología de Barbosa et al. Las 73 muestras positivas fueron sometidas a caracterización antigénica, de las cuales el 72,60% fueron compatibles con algún patrón de lectura del panel de MAb; el 63,01% fueron compatibles con AgV 3; El 9,59% fueron compatibles con AgV 2 y el 27,40% no coincidieron con ningún patrón de lectura y fueron remitidos a secuenciación genética. Las 20 muestras enviadas a la secuenciación parcial del gen N se agruparon en el grupo AgV 3, con *bootstrap* de 99%. En el estado de Pará, se observó un cambio en el ciclo epidemiológico de la rabia, por lo tanto, el AgV 3, asociado al murciélago vampiro *Desmodus rotundus*, fue ampliamente identificado. Estos datos difieren de los encontrados en otras décadas, en las que predominaba AgV 2, este cambio posiblemente sea resultado de campañas masivas de vacunación. También fue posible observar que la distribución temporal de la rabia en el estado sugiere posibles fallas en las acciones de control y prevención de la enfermedad.

**Palabras clave:** Virus de la rabia; Diagnóstico; Vigilancia Epidemiológica.

## 1. Introdução

A raiva é uma doença causada pelo *Rabies lyssavirus* (RABV) (ICTV, 2019), um vírus que se replica em neurônios (Mattos et al., 2000), caracterizando-se como uma infecção responsável por gerar encefalite aguda (Albas et al. 2005). É uma doença antroponozoonótica (Appolinario et al, 2015), de distribuição cosmopolita, com altas taxas de letalidade (Teixeira et al, 2015). Na América Latina, os cães sempre foram considerados os principais reservatórios do RABV (Brasil, 2008), entretanto, desde a década de 1980, por conta das campanhas de vacinação de animais domésticos, observa-se uma redução de mais 90% no número de casos de transmissão da raiva por esses animais (Brasil, 2017), por conseguinte, em 2004, o morcego hematófago *Desmodus rotundus* tornou-se o principal transmissor da raiva, pois se alimenta preferencialmente de sangue de mamíferos, sendo atualmente o principal responsável pela manutenção da doença, especialmente nos ciclos silvestre, aéreo e rural (Andrade et al, 2016). No Brasil, até 2003, a variante antigênica (AgV), normalmente encontrada em caninos (variante antigênica 2 - AgV 2), era a principal causa da doença. Em 2004, a variante comumente encontrada no *Desmodus*

*rotundus* (AgV 3) tornou-se a mais identificada em casos de raiva humana, sendo verificada em seis dos sete casos positivos de raiva humana ocorridos entre 2015 e 2017 (Costa & Fernandes, 2016).

As medidas de controle e prevenção aplicadas no Brasil contribuem para o controle da raiva urbana (Brasil, 2011). Porém, os animais silvestres têm contribuído para a manutenção do ciclo da raiva nos centros urbanos, sendo a expansão urbana desordenada, apontada como uma das responsáveis por aproximar o homem e os animais domésticos dos animais silvestres (Souza et al, 2014), principalmente na Amazônia, onde a maioria das comunidades ribeirinhas está localizada longe dos grandes centros urbanos e apresentam grande escassez de infraestrutura básica, para além das características das moradias, que são em sua maioria palafitas, com cobertura de palha, facilitando a entrada de um animal agressor (Nascimento et al, 2017).

A raiva animal ainda é endêmica no Brasil e, de 2011 a 2016 ocorreram 5.448 casos de raiva animal, sendo os bovinos a subfamília mais afetada, com 3.616 casos. Nos últimos anos, tem sido detectado um aumento no número de casos de raiva em outros animais como morcegos, raposas e saguis, e a identificação de novas variantes antigênicas sugere uma mudança no ciclo epidemiológico da raiva no Brasil (Brasil, 2009).

Atualmente, nas Américas, a raiva tem sido transmitida, principalmente, por morcegos, que estão envolvidos no “ciclo aéreo”, no qual tanto morcegos hematófagos quanto não hematófagos mantêm a circulação do vírus e são capazes de transmitir a doença para uma grande variedade de animais domésticos, como cães e gatos, animais de produção, como o gado e os cavalos, e também para humanos (Rodrigues et al, 2017). Na América do Sul, o *Desmodus rotundus* é descrito como o principal reservatório e transmissor da raiva para bovinos. Bovinos e equinos são alvos frequentes da alimentação desta espécie de morcego, e atualmente são as principais espécies de animais afetadas pela doença. O controle da raiva animal transmitida por morcegos hematófagos é baseado na vacinação sistemática de bovinos e no controle das populações de morcegos. Apesar da eficácia das vacinas antirrábicas, a raiva animal, transmitida por morcegos hematófagos, é endêmica em muitos estados brasileiros, causando perdas econômicas significativas aos produtores, e a cobertura vacinal insuficiente parece contribuir para esta situação (Cargnelutti et al, 2017).

Entre 2004 e 2005 foram descritos três surtos de raiva humana no estado do Pará, que ocorreram nos municípios de Viseu (Nordeste Paraense), Portel (Marajó) e Augusto Corrêa (Nordeste Paraense) (Travassos da Rosa et al, 2006). Os dados antigênicos e moleculares, obtidos desses surtos, identificaram exclusivamente a AgV 3. Ressalta-se que no surto de Augusto Corrêa, a AgV 3 também foi identificada em animais domésticos (Barbosa et al, 2008).

A caracterização antigênica e molecular tem possibilitado a identificação e caracterização das variantes circulantes do vírus da raiva (Casseb, 2009), bem como das espécies envolvidas, permitindo uma melhor compreensão do ciclo epidemiológico, da evolução do vírus da raiva e sua dispersão, seja interespecies ou em um hospedeiro específico, ou no surgimento de novas variantes, proporcionando avanços na epidemiologia do RABV (Menozi, 2012). O uso exclusivo de caracterização antigênica usando o painel de anticorpos monoclonais (MAb) é limitado, devido à variedade de AgVs circulantes entre as espécies de morcegos não hematófagos, que não são inteiramente contempladas pelo painel de oito MAb (Mattos et al, 2000). Portanto, o sequenciamento genético deve ser realizado, para fornecer informações mais precisas sobre a relação evolutiva dos isolados, dando-se preferência para a análise da sequência parcial ou total do gene N, sendo este um gene altamente conservado. O estudo genético também é indicado quando a caracterização antigênica gerou resultados atípicos, o que pode ser ocasionado por erros na interpretação da reação (Brasil, 2008).

A vigilância epidemiológica da raiva requer instrumentos laboratoriais e logísticos para ser eficaz (Brasil, 2008). Diante das mudanças no perfil epidemiológico da raiva animal observadas em outros estados do Brasil, investigamos se essas mudanças ocorreram ou não no estado do Pará, pois conhecer a distribuição espaço-temporal dos casos de raiva no estado é de suma importância (Carrieri et al, 2001). Desta forma, as caracterizações antigênicas e genéticas são ferramentas importantes

para determinar e compreender os múltiplos ciclos epidemiológicos (Barbosa et al, 2008) e o potencial de transmissão interespecíes (Costa et al, 2013; Oliveira et al, 2015). Portanto, objetivou-se caracterizar antigênica e geneticamente variantes do vírus da raiva isoladas no Laboratório de Diagnóstico da Raiva do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará, Brasil), bem como verificar a distribuição geográfica, de acordo com as mesorregiões do estado, a partir de amostras do estado do Pará, Amazônia Brasileira, recebidas no período de 2010 a 2017.

## 2. Metodologia

O projeto referente a esta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas (IEC), em 13 de setembro de 2017, sob protocolo nº 38/2017. Este trabalho foi conduzido entre setembro de 2017 e junho de 2018.

Este estudo foi realizado a partir de amostras de animais positivos para o vírus da raiva no estado do Pará. A triagem foi realizada a partir do banco de dados do laboratório de raiva do IEC e as amostras foram selecionadas e agrupadas por espécie e ano. Apenas amostras de encéfalos de animais positivos para raiva em testes de imunofluorescência direta (IFD) e isolamento viral (IV) em camundongos foram incluídas no estudo. Essas amostras foram provenientes do estado do Pará, recebidas entre janeiro de 2010 e dezembro de 2017. As amostras que não atenderam a esses critérios foram excluídas da pesquisa.

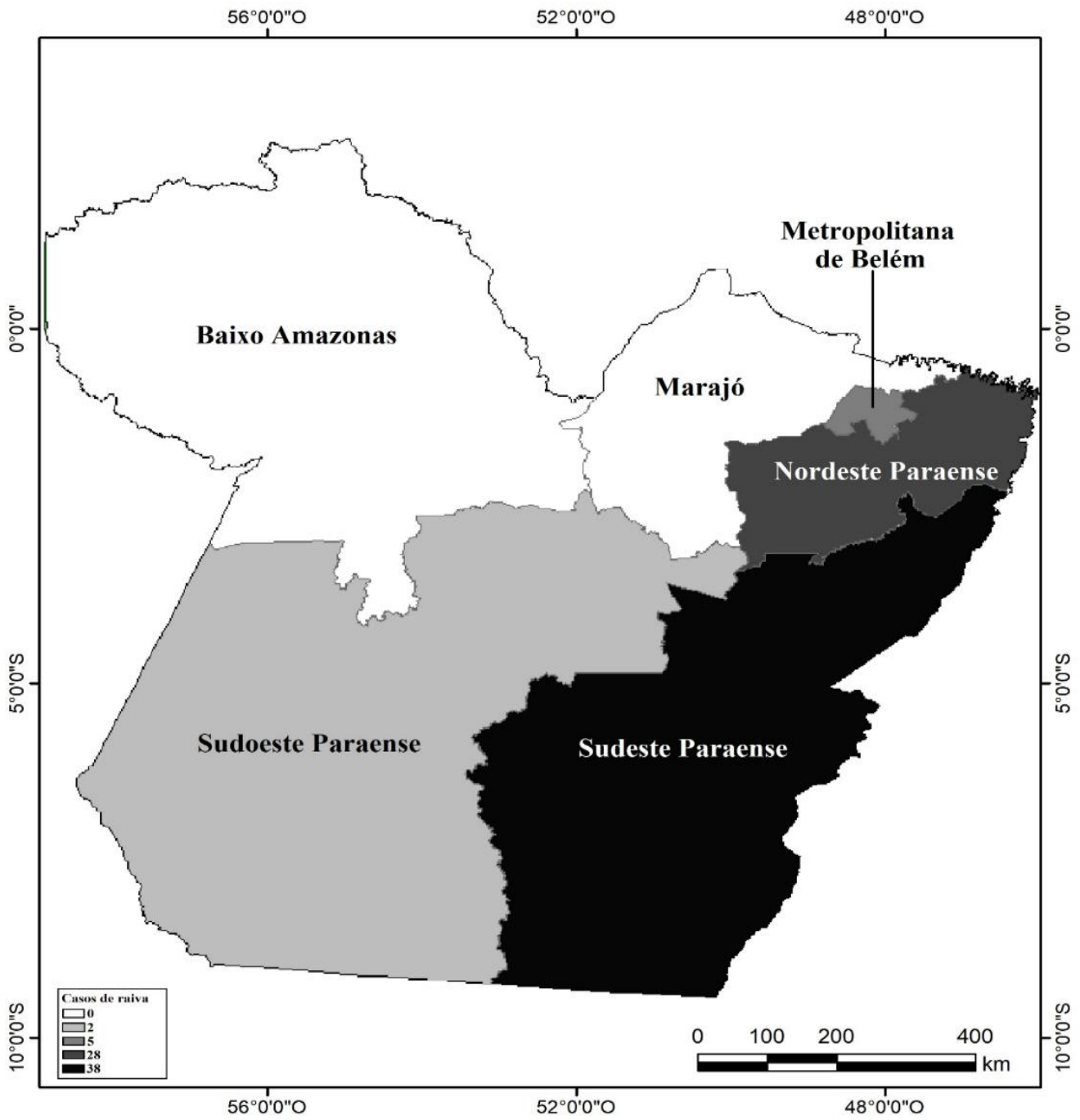
A tipificação antigênica foi realizada de acordo com a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), descrita no Manual de Diagnóstico Laboratorial de Raiva, do Ministério da Saúde (Brasil, 2008). As amostras que não foram compatíveis com as das variantes já identificadas pelo painel de MAbs, recomendados pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), para a identificação de AgV (variantes antigênicas) circulantes nas Américas, utilizado neste estudo, foram caracterizadas geneticamente, de acordo com a metodologia de Barbosa et al (2008).

A distribuição espacial dos casos foi mostrada através de mapa, elaborado por meio do software *QGis versão 2.18.18*, utilizando bases cartográficas disponibilizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

## 3. Resultados

De acordo com o banco de dados do laboratório de raiva do IEC, de janeiro de 2010 a dezembro de 2017, foram analisadas 5.051 amostras de encéfalos animais das mesorregiões do estado do Pará, destas, 73 (1,44%) foram positivas. Das 6 mesorregiões do Pará, 4 (66,66%) registraram casos de raiva durante o período estudado (Figura 1). A mesorregião do Sudeste Paraense representou 52,05% (38/73) dos casos registrados, seguida do Nordeste Paraense com 38,35% (28/73) e Metropolitana de Belém 6,84% (5/73). Das 73 amostras positivas, 65,75% (48/73) eram bovinos, 17,81% (13/73) equinos, 8,22% (6/73) caninos, 6,85% (5/73) quirópteros e 1,37% (1/73) de um felino (Tabela 1). O percentual de positividade entre os anos de 2010 a 2014 foi inferior a 1%. A partir de 2015, com o recebimento de amostras da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ), esse percentual aumentou, atingindo 6,41% (30/468) em 2017 (Tabela 2).

**Figura 1** – Distribuição espacial dos casos de raiva registrados no estado do Pará, de 2010 a 2017.



Fonte: Autores (2022).

**Tabela 1** – Amostras positivas para raiva, por ano, espécie animal acometida e município de origem, 2010-2017.

<b>Ano</b>	<b>Espécie</b>	<b>Município</b>
2010	Canina	Marabá
2010	Equina	Ipixuna do Pará
2010	Equina	Ipixuna do Pará
2011	Canina	Marabá
2011	Canina	Marabá
2011	Canina	Marabá
2011	Quiróptero	Belém
2011	Canina	Marabá
2011	Canina	Marabá
2011	Felina	Marabá
2012	Quiróptero	Tracuateua
2012	Bovina	Castanhal
2012	Equina	Castanhal
2014	Bovina	Eldorado dos Carajás
2015	Bovina	Ulianópolis
2015	Equina	Marabá
2015	Equina	Dom Eliseu
2015	Bovina	Paragominas
2015	Bovina	Ulianópolis
2015	Bovina	Ulianópolis
2015	Bovina	Bannach
2015	Bovina	Ulianópolis
2015	Bovina	Baião
2015	Bovina	Baião
2015	Bovina	Pacajá
2015	Equina	Baião
2015	Bovina	Bom Jesus do Tocantins
2015	Bovina	Abel Figueiredo
2015	Bovina	Paragominas
2015	Bovina	Paragominas
2015	Bovina	São Domingos do Araguaia
2015	Bovina	Pacajá
2015	Bovina	Paragominas
2015	Bovina	São Domingos do Araguaia
2016	Equina	Breu Branco
2016	Bovina	São Geraldo do Araguaia
2016	Bovina	Paragominas
2016	Bovina	Paragominas
2016	Bovina	Bragança
2016	Equina	Bragança
2016	Bovina	Curionópolis
2016	Bovina	Inhangapi
2016	Bovina	Novo Repartimento
2017	Bovina	Bragança
2017	Bovina	Bragança
2017	Equina	Paragominas
2017	Bovina	Bragança
2017	Equina	Conceição do Araguaia
2017	Equina	Bragança
2017	Quiróptero	Belém
2017	Quiróptero	Bragança
2017	Bovina	Bragança
2017	Equina	Conceição do Araguaia
2017	Bovina	Itupiranga
2017	Bovina	Ipixuna do Pará
2017	Bovina	Augusto Corrêa
2017	Bovina	Redenção
2017	Quiróptero	Augusto Corrêa

2017	Bovina	Ipixuna do Pará
2017	Equina	Bragança
2017	Bovina	Viseu
2017	Bovina	Ipixuna do Pará
2017	Bovina	Augusto Corrêa
2017	Bovina	Capitão Poço
2017	Bovina	Novo Repartimento
2017	Bovina	Paragominas
2017	Bovina	Ipixuna do Pará
2017	Bovina	Bragança
2017	Bovina	Paragominas
2017	Bovina	Tomé-Açu
2017	Bovina	Tomé-Açu
2017	Bovina	Ipixuna do Pará
2017	Bovina	Goianésia do Pará

Fonte: Autores (2022).

**Tabela 2** – Número de amostras recebidas, amostras positivas e percentual de positividade no estado do Pará, de acordo com o ano.

Ano	Amostras Recebidas	Amostras Positivas	Positividade (%)
2010	934	3	0,32
2011	1302	7	0,53
2012	879	3	0,34
2013	276	0	0
2014	427	1	0,23
2015	459	20	4,35
2016	311	9	2,89
2017	463	30	6,47

Fonte: Autores (2022).

### 3.1 Caracterização Antigênica

As amostras positivas foram submetidas à caracterização antigênica, utilizando o painel de MAb, previamente estabelecido pelo CDC para caracterizar variantes do vírus da raiva em circulação nas Américas, das quais 72,60% (53/73) eram compatíveis com algum padrão de leitura do painel de MAb. Das variantes virais isoladas de encéfalos bovinos, 64,58% (31/48) foram compatíveis com o padrão de leitura da AgV 3 e 35,42% (17/48) não puderam ser caracterizadas por não corresponderem a nenhum padrão de leitura. Para as amostras de encéfalos de equinos, 84,62% (11/13) foram compatíveis com a AgV 3 e 15,38% (2/13) não corresponderam a nenhum padrão de leitura. Das amostras de encéfalos caninos, 100% (6/6) foram compatíveis com a AgV 2, sendo o mesmo observado na única amostra de felino positiva, que também correspondeu a AgV 2. Das variantes virais isoladas de encéfalos de quirópteros, 80% (4/5) corresponderam a AgV 3, duas dessas amostras eram de encéfalos de *Artibeus planirostris* e duas de *Desmodus rotundus*. Uma amostra de encéfalo de *Artibeus lituratus*, da Mesorregião Metropolitana de Belém, não correspondeu a nenhum padrão de leitura no painel MAb.

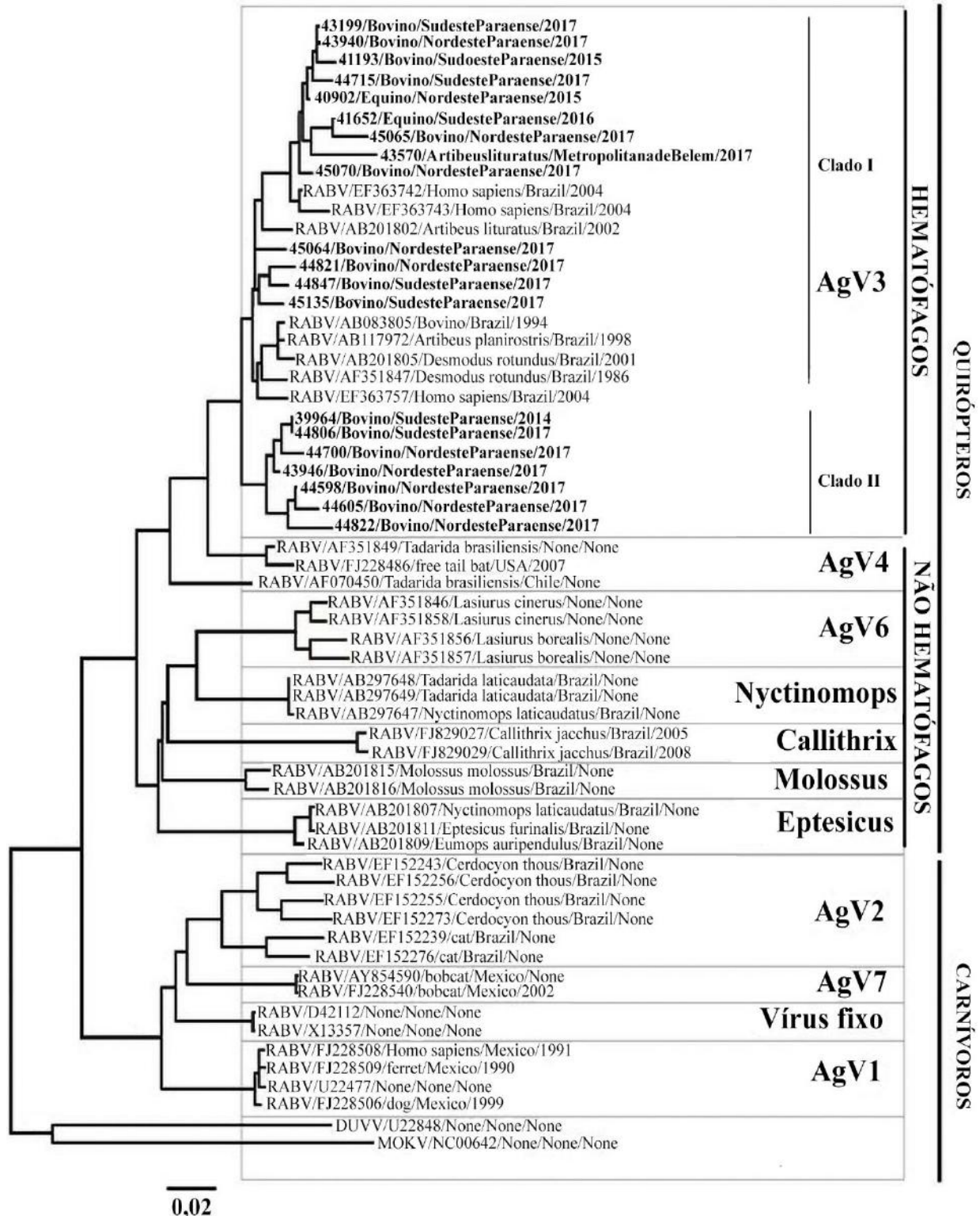
### 3.2 Caracterização Genética

Das 73 amostras submetidas à caracterização antigênica, 20 apresentaram perfil de leitura incompatível com o painel de MAb e foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene N, determinado entre as posições 868 e 1359 da nucleoproteína do RABV. Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se as sequências obtidas de amostras deste estudo e dados disponíveis no Genbank, de isolados de herbívoros, caninos, humanos e morcegos hematófagos, frugívoros e insetívoros. Ambos os métodos utilizados, *Neighbour-Joining* (NJ) e *Bayesian*, apresentaram árvores filogenéticas com topologias semelhantes, utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos. GTR+G (Base [0,2880; 0,1899; 0,2487]; Nst=6;

Rmat=[1,7507; 7,3084; 0,9473; 0,4698; 9,5367]; Rate=gamma, format=0,2860, Pinvar=0) determinado pelo *Akaike Information Criterion* (AIC). A topologia gerada, que foi a mais confiável e que reflete a epidemiologia da raiva, está representada na figura 2. De acordo com a análise filogenética, todas as amostras sequenciadas foram agrupadas no grupo da AgV 3, referente ao morcego hematófago *Desmodus rotundus*, com valor de *bootstrap* de 99%, agrupadas em dois clados. Mas não foi possível observar características territoriais, como agrupamentos de variantes por mesorregião estadual. No clado I, estão presentes amostras das mesorregiões: Sudeste Paraense (43199, 44715, 41652, 44847, 45135), Nordeste Paraense (43940, 40902, 45065, 45070, 45064, 44821), Sudoeste Paraense (41193) e Metropolitana de Belém (43570). No clado II, foram agrupadas amostras das mesorregiões: Sudeste Paraense (39964 e 44806) e Nordeste Paraense (44700, 43946, 44598, 44605 e 44822).



**Figura 2** – Análise filogenética das sequências parciais de nucleotídeos do gene N.



Análise filogenética pelo método NJ com cálculo de *bootstrap* baseado em 1000 pseudorréplicas. A formação de dois grupos principais é observada: Quirópteros e Carnívoros, e subdivisão em clados relacionados à variante antigênica, sendo *Duvenhage virus* e *Mokola virus* usados como um grupo externo. A identificação das amostras deste estudo inicia-se com o número de registro, seguido do hospedeiro, mesorregião e ano de isolamento. As demais variantes do RABV são nomeadas de acordo com o número de acesso do *GenBank*, hospedeiro e país de isolamento, algumas das quais podem conter o ano. Fonte: Autores (2022).

#### 4. Discussão

Considerando os anos deste estudo, a prevalência da raiva na espécie canina foi de 8,21% (6/73), sendo mais prevalente em 2011, com 83,33% (5/6) de casos positivos nesta espécie. Segundo o Ministério da Saúde, o número de casos de raiva canina vem diminuindo no país, onde, entre os anos de 2000 a 2009, foram registrados 3.204 casos de raiva canina no Brasil e no intervalo de 2010 a 2015 foram registrados 290 casos, salientando-se que o ano de 2011 apresentou um dos maiores índices de positividade, portanto, esses dados corroboram com o presente estudo, uma vez que cinco das seis amostras caninas eram do ano de 2011 (Brasil, 2014; Brasil, 2015). A caracterização antigênica de variantes isoladas de epizootias em cães e gatos, nos estados do Maranhão, Ceará e Rio Grande do Norte, identificou a AgV 2, esses dados corroboram o presente estudo, uma vez que a AgV 2 foi identificada em todas as amostras de cães e na única amostra felina positiva. A redução do número de casos de raiva canina acompanha a diminuição da raiva humana, visto que o cão é o principal reservatório e responsável pela manutenção da circulação do vírus no ciclo urbano (Mochizuki et al, 2012).

A circulação do RABV está sob controle na população canina e felina, porém, as ações de vigilância devem ser reforçadas e o apoio de recursos políticos, técnicos e educacionais devem ser continuados. Se a vigilância for reduzida, o vírus pode se restabelecer no ciclo urbano (Casseb, 2009).

Estudos epidemiológicos sobre raiva mostram que no ciclo rural os herbívoros representam a maior ocorrência de raiva. Por meio da análise antigênica e filogenética, observou-se que as amostras bovinas e equinas do estudo eram homólogas ao AgV 3. Esse resultado confirma a importância do *Desmodus rotundus* na manutenção da raiva no ciclo rural (Santos, 2016).

No Rio de Janeiro, foi relatada a ocorrência de casos de raiva em herbívoros em ambientes urbanizados (Souza et al, 2014), corroborando os dados deste estudo, que detectou alto percentual de positividade em herbívoros da Mesorregião Metropolitana de Belém, onde, possivelmente, os animais não estavam sendo acompanhados por médico veterinário e/ou não foram vacinados contra raiva.

Estudos realizados no Brasil, com isolados de herbívoros, encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados, uma vez que a análise filogenética de isolados pertencentes aos estados de Pernambuco, Paraíba (Mochizuki et al, 2012), Pará, Rondônia e Tocantins constatou que todas as amostras analisadas pertenciam a AgV 3 (Peixoto et al, 2014).

Os herbívoros são hospedeiros acidentais do vírus da raiva, pois, não obstante participem da cadeia epidemiológica da raiva no ciclo rural, são considerados animais sentinela da circulação do vírus que, de modo geral, restringe-se à morte do animal, não estando envolvido no ciclo natural de transmissão para outras espécies, exceto quando acidentalmente. Essa afirmação se deve ao fato de que a raiva em herbívoros tem pouca ou nenhuma probabilidade de transmissão para outros animais (Souza et al, 2014), porém, a morte de um profissional de saúde que não havia sido previamente imunizado contra a raiva e que se recusou a fazer profilaxia pós-exposição, após entrar no contato com herbívoro infectado com o vírus da raiva, evidenciou que os veterinários e/ou proprietários que lidam com esses animais estão sob risco de contrair a doença (Casseb, 2009).

Neste trabalho, observamos que a amostra de um *Artibeus lituratus* foi compatível com a AgV 3, resultado que corrobora os achados de outros estudos, como o realizado na cidade de Botucatu, São Paulo, em que morcegos hematófagos e não hematófagos das mais variadas espécies apresentavam a AgV 3 (Fahl, 2009). Em estudo realizado no Rio Grande do Sul, o vírus da raiva foi detectado em morcegos frugívoros, também da espécie *Artibeus lituratus*. Morcegos encontrados na região urbana da cidade de Dois Irmãos foram positivos para o RABV, bem como apresentaram características antigênicas e genéticas compatíveis com às características de amostras isoladas de *Desmodus rotundus* (Batista, 2011). Outro estudo detectou o RABV em morcegos não hematófagos do Rio Grande do Norte. Esse resultado não é surpreendente, uma vez que eventos de transmissão interespecíficos entre morcegos hematófagos e não hematófagos têm sido descritos (Menezes, 2013).

Este fato pode ser facilmente explicado pela possibilidade de transmissão entre diferentes espécies de morcegos, ideia que se torna plausível, visto que várias famílias de morcegos compartilham o mesmo abrigo, ou ainda, devido a sua capacidade de voar, e percorrerem grandes distâncias, compartilhando territórios, o que favorece a transmissão do RABV entre eles (Menozzi, 2012). Os *Desmodus rotundus* podem usar diversos tipos de abrigos e podem compartilhar esse espaço com outras espécies de morcegos, reforçando a teoria da transmissão do vírus entre espécies hospedeiras, possibilitando que variantes do RABV circulem em uma determinada área (Fahl, 2009).

Os morcegos são menos vulneráveis à degradação florestal do que outros mamíferos, devido à capacidade de dispersão para os ambientes periurbanos e urbanos, favorecendo o contato com humanos, animais domésticos e animais de produção (De Lucca et al, 2013).

Em 2007, foi identificado um clado com amostras do Pará no *cluster* AgV 3, subdividido em três subclados: I-a, I-b e I-c. No subclado I-a, foram agrupadas as cepas das mesorregiões do Baixo Amazonas, Nordeste Paraense e Sudeste Paraense. O subclado I-b agrupa quatro linhagens da mesorregião do Nordeste Paraense e o subclado I-c está relacionado a linhagens da mesorregião de Marajó (Travassos da Rosa et al, 2006). O mesmo não pode ser observado no presente trabalho, uma vez que não foi identificada a formação desses clados e subclados, portanto, talvez, um estudo utilizando um bloco contendo apenas amostras do Pará, poderia possibilitar a obtenção desse tipo de agrupamento.

O Pará possui condições climáticas e abrigos para manter as populações de morcegos. Em relação à densidade de gado, o estado do Pará é o segundo maior produtor de gado do Norte do país. Nesse contexto, esses fatores, somados à urbanização desordenada, contribuem para a ocorrência da raiva no estado. Surtos ocorridos na região da Bacia Amazônica em 2004 e 2005, causados por morcegos hematófagos, aumentaram a ocorrência da doença acima dos níveis usuais nesta região. O atual predomínio da transmissão da raiva por morcegos hematófagos na Bacia Amazônica tornou-se equivalente ao número de casos humanos que eram anteriormente transmitidos por cães, diferindo do perfil de outras décadas. Esses dados mostram a mudança no ciclo epidemiológico da raiva (Wada et al, 2009).

A mesorregião do Sudeste Paraense possui vastas áreas de pastagem de gado, sendo o principal produtor de gado do estado. No entanto, é caracterizado por baixas taxas de desmatamento. A presença de pastagens próximas a áreas de mata favorece o acesso de morcegos aos animais de produção e essas características da mesorregião estão refletidas nos resultados aqui obtidos, uma vez que o Sudeste Paraense apresentou o maior número de casos positivos e, onde, em herbívoros, foi detectado exclusivamente AgV 3 (Andrade et al, 2016).

No Nordeste Paraense estão algumas das principais áreas de desmatamento no Pará, principalmente na zona costeira, que é um mosaico de manguezais próximo a paisagens antropogênicas, sendo esta mesorregião a terceira maior produtora de gado do estado. Os manguezais são considerados ambiente importante para muitas espécies de mamíferos, incluindo morcegos, visto que riachos e outros corpos d'água podem fornecer corredores de acesso, ligando diferentes *habitats* e possibilitando a dispersão de morcegos hematófagos, além de reforçar a adaptabilidade dessa espécie às mudanças nas características do *habitat* (Andrade et al, 2016; IBGE, 2020). As características supracitadas reforçam os resultados deste estudo, uma vez que esta mesorregião obteve a segunda maior prevalência de casos de raiva em herbívoros, bem como a maior prevalência de casos de raiva em morcegos, sendo a AgV 3 identificada em todos os casos positivos.

No sudoeste Paraense, as áreas de médio risco para o gado estão gradativamente mudando para áreas de alto risco, com exceção de uma grande zona central que coincide com reservas indígenas e áreas de proteção ambiental. As evidências indicam um baixo número de casos de raiva em geral, principalmente no Sudoeste Paraense, possivelmente porque os grandes rebanhos encontrados nesta região estão concentrados em um pequeno número de fazendas de grandes dimensões, portanto, locais onde as autoridades de saúde pública e os proprietários das terras monitoram e controlam de forma mais eficaz as zoonoses (Andrade et al, 2016).

As mesorregiões de Baixo Amazonas e Marajó não obtiveram resultados positivos durante o período estudado, porém esses resultados não representam a ausência da doença, ao contrário, essa diferença entre as mesorregiões pode indicar áreas silenciosas em que provavelmente ocorre subnotificação (Brasil, 2013).

A caracterização antigênica e genética permite documentar a mudança e/ou manutenção do ciclo epidemiológico da raiva no estado do Pará. Em estudo realizado anteriormente no estado do Pará, observou-se que entre 2000 e 2004, as espécies mais afetadas foram caninas, humanas e felinas. Em 2005, foi registrado um número elevado de casos de raiva em animais de produção e humanos, com a identificação da AgV 3, bem como houve uma redução no número de casos transmitidos por cães, além de um aumento no número de casos transmitidos por morcegos. No presente estudo, foram observadas em amostras sequenciadas, o alinhamento com a AgV 3, e os resultados encontrados no estado do Pará foram semelhantes aos encontrados em outros estados do Brasil e em outros países da América Latina (Travassos da Rosa, 2006).

## 5. Conclusão

Em conclusão, observamos que a distribuição temporal dos casos de raiva animal, mostram que houve aumentos e reduções no número de casos ao longo do período estudado, sugerindo possíveis falhas nas ações de controle e prevenção. Também foi observada uma mudança no ciclo epidemiológico da raiva no estado do Pará, onde, a AgV 3 associada ao *Desmodus rotundus*, foi amplamente identificada, diferindo de outras décadas nas quais a AgV 2, associada a cães e gatos, era predominante. Essa mudança está de acordo com mudanças no ciclo epidemiológico identificadas em outros estados e países. A associação de técnicas de caracterização antigênica e genética possibilitou um melhor entendimento da epidemiologia molecular do vírus da raiva no estado do Pará.

## Conflitos de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

- Albas A., Pardo P. E., Bremer Neto H., Gallina N. M. F., Mourão Fuchs R. M. & Sartori A. (2005). Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arquivos Instituto Biológico*, 72 (2), 153-159.
- Andrade F. A. G., Gomes M. N., Uieda W., Begot A. L., Ramos O. S. & Fernandes M. E. B. (2016). Geographical Analysis for Detecting High-Risk Areas for Bovine/Human Rabies Transmitted by the Common Hematophagous Bat in the Amazon Region, Brazil. *PLoS ONE*, 11(7), e0157332.
- Appolinario C. M., Allendorf S. D., Peres M. G., Fonseca C. R., Vincente A. F., Antunes J. M., Pantoja J. C. F. & Megid J. (2015). Evaluation of short-interfering RNAs treatment in experimental rabies due to wild-type virus. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(5), 453-458.
- BRASIL. (2008). Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva.
- BRASIL. (2009). Protocolo para tratamento de raiva humana no Brasil.
- BRASIL. (2011). Normas Técnicas de Profilaxia da Raiva Humana.
- BRASIL. (2014). Raiva. In: Guia de Vigilância Epidemiológica.
- BRASIL. (2015). Situação da raiva no Brasil.
- BRASIL. (2017). Óbitos de Raiva Humana, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2017.
- BRASIL. (2013). Análise de indicadores epidemiológicos da raiva dos herbívoros no Brasil.
- Barbosa T. F., Medeiros D. B., Travassos da Rosa E. S., Casseb L. M. N., Medeiros R. C., Pereira A. S., Vallinoto A. C., Vallinoto M., Begot A. L., Lima R. J., Vasconcelos P. F. C. & Nunes M. R. (2008). Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology*, 20 (2), 228-36.
- Batista H. (2011). Caracterização antigênica e molecular de isolados e desenvolvimento de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o vírus da raiva (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Casseb L. M. N. (2009). Estudo Epidemiológico da raiva, caracterização antigênica e genética de cepas do vírus da raiva isoladas na Amazônia Brasileira (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Pará.

- Cargnelutti J. F., Quadros J. M., Martins M., Batista H. B. C. R., Weiblen R. & Flores E. F. (2017). Glycoprotein-G-gene-based molecular and phylogenetic analysis of rabies viruses associated with a large outbreak of bovine rabies in southern Brazil. *Arch Virol*, 162 (12), 3697-3704.
- Carrieri M. L., Mattos C. A., Carnieli P., Mattos C., Favoretto S. R. & Kotait I. (2001). Canine and feline rabies transmitted by variant 3 - Desmodus rotundus – in the state of São Paulo, Brazil. In: Seminário Internacional de morcegos como transmissores de raiva. Instituto Pasteur.
- Costa L. J., Andrade F. A., Uieda W., Martorelli L.F., Kataoka A. P. & Fernandes M. E. (2013). Serological investigation of rabies virus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 107(11), 684-9.
- Costa L. J. C. & Fernandes M. E. B. (2016). Rabies: Knowledge and Practices Regarding Rabies in Rural Communities of the Brazilian Amazon Basin. *PLoS Negl Trop Dis*, 10 (2), e0004474.
- De Lucca T., Rodrigues R. C., Castagna C., Presotto D., De Nadai D. V., Fagre A., Braga G. B., Guilloux A. G., Alves A. J., Martins C. M., Amaku M., Ferreira F. & Dias R. A. (2013). Assessing the rabies control and surveillance systems in Brazil: an experience of measures toward bats after the halt of massive vaccination of dogs and cats in Campinas, Sao Paulo. *Prev Vet Med*, 111 (1-2),126-33
- Fahl W. (2009). 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 (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo.
- IBGE. (2020). Pesquisa da Pecuária Municipal.
- ICTV. (2019). Virus Taxonomy: 2019 Release.
- Mattos C. A., Favi M., Yung V., Pavletic C. & de Mattos C. C. (2000). Bat rabies in urban centers in Chile. *J Wildl Dis*, 36 (2), 231-40.
- Menezes W. (2013). Caracterização Molecular de isolados do vírus rábico dos Estados do RN, PB e PE (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal do Semi-Árido.
- Menozi B. D. (2012). Caracterização antigênica e genotípica de isolados do vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu – SP e região (Dissetação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista.
- Mochizuki N., Kawasaki H., Silva M. L., Afonso J. A., Itou T., Ito F. H. & Sakai T. (2012). Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 - 2009. *BMC Res Notes*, 5 (32).
- Nascimento R. G., Cardoso R. O., Santos Z. N. L., Pinto D. S. & Magalhães C. M. C. (2017). Housing conditions and the degree of home satisfaction of elderly riverside residents of the Amazon region. *Psico-USF*, 22 (3), 389-399.
- Oliveira R. S., Costa L. J. C., Andrade F. A. G., Uieda W., Martorelli L. F. A. & Kataoka A. P. A. G. (2015). Virological and serological diagnosis of Rabies in bats from an urban area in the Brazilian Amazon. *Virology*, 57(5), 497-503.
- Peixoto H. C., Estévez A. I., Silva O. S., Ramos O. S., Silva L. P. & Brandão P. E. (2014). Molecular epidemiology of rabies virus isolated herbivores from Brazilian Amazon. *Braz. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 51 (2), 122-130.
- Rodrigues R. C. A., Zuben A. P. B. V., Lucca T. & Reichmann MLAB. (2017). Rabies vaccination campaigns in dogs and cats, and rabies positivity in bats, from 2004 to 2014, in Campinas, São Paulo, Brazil. *Epidemiol Serv Saude*, 26 (3), 621-628.
- Santos G. R. (2016). Caracterização epidemiológica e molecular da raiva em bovinos no Estado de Pernambuco, Brasil (Tese de Doutorado).Universidade Estadual Paulista.
- Souza P. G., Amaral B. M. P. M. & Gitti C.B. (2014). Raiva animal na cidade do Rio de Janeiro: emergência da doença em morcegos e novos desafios para o controle. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 73 (1), 119-24.
- Teixeira L. H. M., Tomaz L. A. G., Linhares G. F. C., Santos M. F. C. & Jayme V. S. (2015). Distribuição espaço-temporal dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal. *Ciência Animal Brasileira*,16 (1),144-157.
- Travassos da Rosa E. S., Kotait I., Barbosa T. F., Carrieri M. L., Brandão P. E., Pinheiro A.S., Begot A. L., Wada M. Y., de Oliveira R. C., Grisard E. C., Ferreira M., Lima R. J., Montebello L., Medeiros D. B., Sousa R. C., Bensabath G., Carmo E. H. & Vasconcelos P. F. C. (2006). Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*, 12(8),1197-202.
- Wada M., Rocha S. & Maia-Elkhoury A. N. S. (2009). A situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 20 (4), 509-518.