

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Gisane Lanes de Almeida

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA DE
HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO SUL (2012-2017) E VALIDAÇÃO
DE UM TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO**

Santa Maria, RS
2020

Gisane Lanes de Almeida

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA DE
HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO SUL (2012-2017) E VALIDAÇÃO DE UM
TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Rudi Weiblen

Santa Maria, RS
2020

Gisane Lanes de Almeida

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA DE
HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO SUL (2012-2017) E VALIDAÇÃO DE UM
TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2020:

Rudi Weiblen, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Eduardo Furtado Flores, PhD. (UFSM)

Juliana Felipetto Cargnelutti, Dra. (UFSM)

Paulo Michel Roehle, PhD. (UFRGS)

Diego Viali dos Santos, Dr. (MAPA)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial ao meu pai Adão Lanes de Almeida que infelizmente não está mais entre nós para presenciar esse momento. Dedico este trabalho como forma de agradecimento pela educação, incentivo e compreensão recebidos e pela união, força e amor mútuos.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu pelo apoio, auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo. De uma maneira especial, agradeço:

- À minha família, em especial ao meu companheiro José Osvaldo Jardim Filho e meu filho Martín Lanes de Almeida Jardim, pelo amor, dedicação, carinho, paciência, compreensão e pela força diária que necessitei em todos os momentos nessa caminhada;

- Aos professores Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores e Juliana Felipetto Cargnelutti, por terem acreditado em mim e pela orientação, ensinamentos, apoio e amizade durante os anos de doutorado;

- À Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul, nas pessoas de Antônio Carlos de Quadros Ferreira Neto, Nilton Antônio Rossato, Juliana Siqueira Argenta, Ernani Brunelli Alves e Wilson Hoffmeister Junior, pelo apoio e pareceres favoráveis à realização deste estudo, o que garantiu meu afastamento para missão científica;

- À equipe do Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, pois todos deram de alguma forma sua contribuição para a realização deste trabalho;

- Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, nas pessoas de Júlio César de Almeida Rosa e José Carlos Ferreira, e à Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista e Rodrigo Spolaor Fantinel, pela colaboração com amostras e informações utilizadas neste estudo;

- Ao Laboratório de Patologia Veterinária, ao Laboratório de Doenças Parasitárias e ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria, pelo auxílio com amostras, equipamentos e reagentes;

- À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de cursar a pós-graduação e pelo suporte financeiro.

RESUMO

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA DE HERBÍVOROS NO RIO GRANDE DO SUL (2012-2017) E VALIDAÇÃO DE UM TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO

AUTOR: Gisane Lanes de Almeida

ORIENTADOR: Rudi Weiblen

O vírus da raiva (*Rabies lyssavirus*, RABV) é o agente da raiva, uma doença zoonótica de distribuição mundial, caracterizada por sinais neurológicos graves, de curso geralmente fatal, que afeta mamíferos domésticos e selvagens. O RABV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. O genoma do RABV consiste de uma molécula de RNA de fita simples de sentido negativo, com aproximadamente 12 quilobases (kb) e contém 5 genes, entre eles o gene da nucleoproteína (N) que é altamente conservado e tem sido amplamente utilizado como alvo de estudos filogenéticos, assim como no desenvolvimento de testes de diagnóstico. No primeiro estudo que compõe esta Tese, descreve-se uma análise filogenética de 145 amostras de RABV oriundas de herbívoros no Rio Grande do Sul (RS), entre 2012 e 2017, baseada na análise da sequência parcial do gene da proteína N. Estas sequências exibiram uma alta identidade de nucleotídeos (nt) e similaridade de aminoácidos (aa) entre si, bem como com sequências de RABV identificadas em bovinos e de morcegos hematófagos. Os vírus segregaram em dois *clusters* distintos. O *cluster 1* agrupou sequências de RABV abrangendo todo o período estudado, enquanto o *cluster 2* agrupou um número menor de vírus detectados em 2013, 2014, 2015 e 2017. Em alguns casos, vírus obtidos de uma mesma região em um curto período de tempo agruparam em *clusters* ou *sub-clusters* distintos, indicando a co-circulação de vírus de diferentes linhagens. A separação em *sub-clusters* também foi observada em sequências virais obtidas de uma mesma região em diferentes momentos, indicando o envolvimento de mais de um vírus. O segundo estudo reporta o desenvolvimento e validação de um ensaio em tempo real, baseado em transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia (RT-PCR em tempo real; RT-qPCR) para o diagnóstico da raiva em bovinos. Os *primers* foram desenhados visando a região altamente conservada do gene da proteína N a partir de sequências de RABV de bovinos do RS obtidas do GenBank. O limite de detecção correspondeu a 12,99 cópias de DNA e a repetibilidade intra- e inter-ensaio foi adequada. Não foram detectadas ampliações inespecíficas com outros patógenos de síndromes neurológicas semelhantes à raiva em bovinos no RS, nem contaminação cruzada. Amostras de cérebro bovino de 21 casos suspeitos de raiva foram testadas com o novo ensaio e com o teste padrão-ouro de imunofluorescência direta (FA). A sensibilidade e a especificidade da RT-qPCR foram determinadas. A sensibilidade e a especificidade diagnóstica foram ambas 100%. Em resumo, os estudos apresentados na presente Tese revelaram uma alta conservação do gene da proteína N e a circulação de duas linhagens e sub-linhagens diferentes de RABV no RS, confirmando a adequação do gene N no estudo das relações genéticas entre amostras de RABV. Além disso, a RT-qPCR se apresentou sensível e específica nos critérios analítico e diagnóstico. Em função disso, o ensaio aqui proposto se mostrou útil para diagnóstico da raiva em bovinos, apresentando rapidez, sensibilidade e especificidade adequadas.

Palavras-chave: RABV. Caracterização molecular. Nucleoproteína. RT-qPCR. Diagnóstico.

ABSTRACT

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF RABIES VIRUS SAMPLES FROM HERBIVORES IN RIO GRANDE DO SUL (2012-2017) AND VALIDATION OF A REAL-TIME RT-PCR FOR DIAGNOSIS

AUTHOR: Gisane Lanes de Almeida

ADVISOR: Rudi Weiblen

Rabies virus (*Rabies lyssavirus*, RABV) is the agent of rabies, a zoonotic disease distributed worldwide, characterized by severe neurological signs of course generally fatal in domestic and wild mammals. The RABV belongs to the order *Mononegavirales*, family *Rhabdoviridae* and genus *Lyssavirus*. The RABV genome consists of a single-stranded, negative-sense RNA molecule of approximately 12 kilobases (kb) containing 5 genes, including the highly conserved nucleoprotein (N) gene. The N gene has been widely used as a target in phylogenetic studies and for development of molecular tests for diagnosis. In a first study, we describe a phylogenetic analysis of 145 RABV recovered from herbivorous from Rio Grande do Sul state (RS) between 2012 and 2017, based on partial sequence analysis of the N gene. These sequences displayed a high sequence nucleotide (nt) identity and amino acid (aa) similarity to each other and with bovine and hematophagous bat RABV sequences. The viruses segregated into two distinct clusters. Cluster 1 comprised RABV sequences covering the whole studied period, whereas cluster 2 grouped a lower number of viruses from 2013, 2014, 2015 and 2017. In some cases, viruses obtained from the same region within a short period of time grouped to distinct clusters or sub-clusters, indicating the co-circulation of distinct virus lineages in these outbreaks. The segregation into sub-clusters was also observed for viral sequences obtained from the same region at different times, indicating the involvement of distinct viruses. The second study reports the development and validation of a real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) for diagnostics of rabies in cattle. The primers were designed targeting the highly conserved N gene of RABV from samples obtained from cattle in RS, obtained from GenBank. The detection limit corresponded to 12.99 DNA copies and the intra- and inter-run repeatability was adequate. Non-specific amplification with a range of other pathogens causing neurological syndromes similar to rabies in cattle in RS, as well as cross-contamination were not detected. Bovine brain samples from 21 suspected cases of rabies were tested with the new RABV RT-qPCR assay and with a gold-standard fluorescent antibody test (FAT) and the sensitivity and specificity of the RT-qPCR assay were determined. Both the sensitivity and specificity of the RT-qPCR were 100%. In summary, the studies presented in this Thesis revealed a high conservation of N protein gene and the circulation of two lineages and different sublineages of RABV in the RS, confirming the suitability of N gene to study the genetic relationships among RABV isolates. Furthermore, the RABV RT-qPCR assay provides is analytically and diagnostically sensitive and specific. Thus, this assay may be very useful for a rapid, sensitive and specific diagnosis of rabies in cattle.

Keywords: RABV. Molecular characterization. Nucleoprotein. RT-qPCR. Diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva e RNAs mensageiros.....	18
Figura 2 – Esquema ilustrativo da partícula do vírus da raiva, com as respectivas proteínas.....	19
Figura 3 – Ciclo replicativo simplificado do vírus da raiva em célula susceptível.....	21
Figura 4 – Ciclos epidemiológicos da raiva no Brasil.....	25
Figura 5 – Processo de validação de um teste de diagnóstico segundo o padrão de validação da Organização Mundial de Saúde Animal.....	29

ARTIGO 1

Figura 1 – Fig. 1 Phylogenetic tree with Cluster 2 compressed constructed by the Maximum Likelihood method with the General Time Reversible (GTR) substitution model of RABV N gene partial sequences recovered from herbivores in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....	50
Figura 2 – Fig. 2 Phylogenetic tree with Cluster 1 compressed constructed by the Maximum Likelihood method with the General Time Reversible (GTR) substitution model of RABV N gene partial sequences recovered from herbivores in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....	51
Figura 3 – Fig. 3 Cases/outbreaks of herbivorous rabies in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....	52
Figura 4 – Online Resource 4 Amino acid alignment of herbivorous RABV nucleoprotein partial sequences (position 23 to 150).....	66
Figura 5 – Online Resource 4 Amino acid alignment of herbivorous RABV nucleoprotein partial sequences (position 151 to 300).....	67
Figura 6 – Online Resource 4 Amino acid alignment of herbivorous RABV nucleoprotein partial sequences (position 301 to 450).....	68

ARTIGO 2

Figura 1 – Fig. 1. Scatter plot with the regression line (solid line) of a 10-fold (v:v) dilution series of a bovine RABV synthetic prepared with a nucleic acid load covering the linear range.....	85
Figura 2 – Fig. 2. Diagnostic sensitivity and specificity estimates calculated from set of results for samples bovine brain samples of known infection status to rabies virus.....	86

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Membros do gênero <i>Lyssavirus</i> : classificação em genótipos e filogrupos e distribuição geográfica.....	16
---	----

ARTIGO 1

Tabela 1 – Table 1 Nucleotide and amino acid identity in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivorous species in Rio Grande do Sul state, Brazil, compared to domestic carnivore RABV sequence (GenBank access KX148217), bovine RABV sequence (GU592649), <i>Desmodus rotundus</i> RABV sequence (GU592648) and among the sequences this study.....	49
Tabela 2 – Online Resource 1 Identification, species from which the samples were obtained, location, geographical coordinates, year and GenBank accession number of rabies virus introduced in this work.....	53
Tabela 3 – Online Resource 2 Nucleotide changes observed in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivorous species in Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighbor regions, grouped in cluster 1, when compared to CVS-PV sequence (standard RABV, GenBank access M13215)	63
Tabela 4 – Online Resource 3 Nucleotide changes observed in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivorous species in Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighbor regions, grouped in cluster 2, when compared to CVS-PV sequence (standard RABV, GenBank access M13215).....	65

ARTIGO 2

Tabela 1 – Table 1 Inter- and intra-run variation for 15 two-fold dilutions of RABV synthetic DNA.....	83
Tabela 2 – Table 2 Data table for bovine brain samples of known infection status included in the analysis of sensitivity and specificity of the RABV RT-qPCR (PCR) and fluorescent antibody test (FAT) assays for detection of RABV in bovine brains.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChR	Receptor de acetilcolina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSe	Sensibilidade de diagnóstico
DSp	Especificidade de diagnóstico
DUVV	Vírus de Duvenhage
FAT	Teste da imunofluorescência
G	Glicoproteína
JNM	Junção neuromuscular
kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
L	Polimerase
LBV	Vírus do morcego de Lagos
Le	<i>Leader</i>
M	Proteína da matriz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOKV	Vírus de Mokola
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	Nucleoproteína
NCAM	Molécula de adesão da célula neural
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fosfoproteína
P75NTR	Receptor de neurotrofismo
PCR-ELISA	Reação em cadeia da polimerase associada ao ensaio imunoenzimático
PNCRH	Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RABV	Vírus da raiva
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RS	Rio Grande de Sul
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real
SEAPDR	Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural
SNC	Sistema nervoso central
tRNA	Ácido ribonucleico transportador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	O VÍRUS DA RAIVA (RABV)	15
2.2	GENOMA E PROTEÍNAS VIRAIS	17
2.3	REPLICAÇÃO VIRAL	19
2.4	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	23
2.5	EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA.....	24
2.6	DIAGNÓSTICO	27
2.6.1	Validação de testes de diagnóstico	28
2.7	TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE	30
2.7.1	Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora (PNCRH)	30
3	ARTIGO 1 - Sequence analysis of nucleoprotein gene reveals co-circulation of lineages and sublineages of rabies virus in herbivores in Rio Grande do Sul state, Brazil	33
	Abstract.....	34
	Introduction.....	35
	Materials and methods	36
	Results.....	37
	Discussion.....	40
	Acknowledgements.....	42
	Funding	42
	Conflict of interest	42
	Ethical approval	43
	References.....	43
4	ARTIGO 2 - An RT-qPCR assay for rapid diagnosis of rabies in cattle	69
	Summary	70
	Introduction.....	71
	Materials and methods	72
	Results.....	74
	Discussion.....	75
	Funding	77
	Declaration of interest.....	77
	Acknowledgements.....	77
	References.....	78
5	DISCUSSÃO	87
6	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

O vírus da raiva (*Rabies lyssavirus*, RABV) é o agente da raiva, uma doença zoonótica de distribuição mundial, caracterizada por sinais neurológicos severos de curso geralmente fatal, e que acomete mamíferos domésticos e selvagens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). O RABV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2018). Os vírions apresentam uma forma de projétil e são compostos por duas unidades estruturais: um nucleocapsídeo helicoidal interno e um envelope lipídico. O genoma, formado por uma cadeia simples de ácido ribonucleico (RNA) de sentido negativo, possui aproximadamente 12 quilobases (kb) e contém cinco genes, que codificam cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e polimerase (L) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011).

Historicamente, a raiva tem causado importantes perdas a rebanhos bovinos em várias regiões do Brasil, acarretando um impacto econômico negativo à cadeia produtiva, além dos gastos indiretos que podem ocorrer com a vacinação de milhões de bovinos e inúmeros tratamentos pós-exposição (soro-vacinação) de pessoas que tiveram contato com animais suspeitos (BRASIL, 2009). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nas últimas duas décadas foram registrados 38.170 casos de raiva em bovinos de todo o país, sendo 2.064 no Rio Grande do Sul (RS) (BRASIL, 2020a).

O RABV se perpetua na natureza por ciclos de infecção envolvendo carnívoros terrestres e morcegos. Na América do Sul, os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* são os principais transmissores do RABV para os herbívoros (BANYARD et al., 2011). Para frear a disseminação do vírus e diminuir as perdas produtivas, é fundamental que sejam determinadas as origens do RABV, os seus padrões de disseminação pelos hospedeiros/transmissores, bem como a relação entre as colônias de morcegos e os rebanhos bovinos afetados. A caracterização molecular e filogenética de isolados de raiva de alguns estudos tem ajudado a prever a futura ocorrência de casos e, desta forma, tem contribuído para a adoção de medidas de prevenção e controle (ITO et al., 2001b; VELASCO-VILLA et al., 2006).

A sequência de nucleotídeos do gene da proteína N é altamente conservada entre amostras de RABV e, por isso, tem sido amplamente usada como alvo em testes diagnósticos baseados na detecção de ácidos nucleicos (ARAVINDHBABU et al., 2012; ARAVINDHBABU, MANOHARAN, RAMADASS, 2014; BLACK et al., 2002; DEDKOV et

al., 2018; FAYE et al., 2017; HOFFMANN et al., 2010; MACEDO et al., 2006; NADIN-DAVIS, SHEEN, WANDELER, 2009; NAJI et al., 2020; SACRAMENTO, BOURHY, TORDO, 1991; SOARES et al., 2002; WACHARAPLUESADEE et al., 2008; WADHWA et al., 2017) e para a identificação genética de linhagens, sub-linhagens e variantes virais (BATISTA et al., 2009; CASTILHO et al., 2008; ITO et al., 2001a, 2001b, 2003; KOBAYASHI et al., 2005, 2006, 2008; MOCHIZUKI et al., 2012, QUEIROZ et al., 2012; ROMIJN et al., 2003; SCHAEFER et al., 2005). Amostras de RABV adaptadas à diferentes espécies (variantes) apresentam alterações/mutações de nucleotídeos conservadas, que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos (ARAI et al., 1997; ITO et al., 2001b; 2003; PAEZ et al., 2003). Além disso, a proteína N é base para vários testes diagnósticos baseados na detecção de antígenos (AHMED et al., 2012; CAPORALE et al., 2009; MADHUSUDANA et al., 2004; 2012; NISHIZONO et al., 2008; PERRIN et al., 1992; RAHMADANE et al., 2017) e anticorpos (DYER et al., 2013; ESTERHUYSEN, PREHAUD, THOMSON, 1995; REALEGENO et al., 2018; SUGIYAMA et al., 1997).

As análises moleculares e filogenéticas de isolados de RABV tornaram-se ferramentas importantes para determinar a origem dos vírus e entender, por exemplo, os padrões temporais e espaciais de disseminação/dispersão de colônias de morcegos vampiros, que são os principais transmissores da raiva aos herbívoros (KOBAYASHI et al., 2008; CARNIELI JUNIOR et al., 2009; VELASCO-VILLA et al., 2006). As informações coletadas em alguns estudos ajudaram a prever a ocorrência futura de casos e, assim, permitiram a adoção de medidas de prevenção e controle (ITO et al., 2001b; KANITZ et al., 2014). Em geral, estudos de filogenia e dispersão do RABV foram realizados através da análise do gene da G completo, da região intergênica G-L e/ou análise do gene da N parcial ou completo (ITO et al., 2001b; SATO et al., 2004). Nesse sentido, o gene da proteína N tem sido o alvo preferido para a análise de sequência, uma vez que é o gene mais conservado entre os lissavírus (WUNNER, 2007). Em função disso, inicialmente foi realizada uma análise filogenética de 145 RABV recuperados de herbívoros no RS de 2012 a 2017, baseada na análise da sequência parcial do gene da proteína N, que originou o artigo 1 intitulado *Sequence analysis of nucleoprotein gene reveals co-circulation of lineages and sublineages of rabies virus in herbivores in Rio Grande do Sul, Brazil*.

Quando há exposição humana, um diagnóstico rápido e confiável no animal suspeito pode ser muito importante para definir medidas de prevenção, controle e tratamento de pessoas expostas. A gravidade da infecção e as implicações de um resultado inconclusivo ou falso-negativo reivindicam o uso de testes diagnósticos complementares para a confirmação do diagnóstico com alta acurácia. Os testes biológicos (ex.: teste de inoculação em camundongos)

recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) podem levar de 5 a 28 dias para chegar aos resultados (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c). A reação de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR), também denominada RT-PCR quantitativa (RT-qPCR), tem se mostrado uma alternativa eficaz como técnica complementar de diagnóstico da raiva (DEDKOV et al., 2018; FAYE et al., 2017; HOFFMANN et al., 2010; NADIN-DAVIS, SHEEN, WANDELER, 2009; WACHARAPLUESADEE et al., 2008; WADHWA et al., 2017). A RT-qPCR pode facilitar o diagnóstico de raiva, principalmente nos casos inconclusivos pela imunofluorescência (FAT). Além disso, o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico molecular rápida e adequada para o teste de um grande número de amostras do RABV pode ser importante para a rotina diagnóstica e para a vigilância epidemiológica, particularmente no RS, onde a raiva herbívora permanece endêmica (BRASIL, 2020a). Portanto, uma RT-qPCR foi desenvolvida e validada para o diagnóstico da raiva em bovinos, constituindo o artigo 2 com o título *An RT-qPCR assay for rapid diagnosis of bovine rabies*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O VÍRUS DA RAIVA (RABV)

O RABV é o agente da raiva, uma doença zoonótica de distribuição mundial, caracterizada por sinais neurológicos severos de curso geralmente fatal e que acomete mamíferos domésticos e selvagens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Segundo o *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (2011, 2018), o RABV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Os vírions apresentam uma forma de projétil e são compostos por duas unidades estruturais: um nucleocapsídeo helicoidal interno e um envelope lipídico.

O nucleocapsídeo é composto por um complexo de ribonucleoproteína (RNP) formado pelo genoma RNA e proteínas N, P e L (RNA polimerase dependente de RNA). A exata posição da proteína M permanece controversa, e pode estar contida no canal central da RNP ou formando uma hélice entre a RNP e a membrana dos vírions. A glicoproteína G é composta por quatro domínios distintos: um peptídeo de sinal (não-estrutural), um ectodomínio, um peptídeo transmembrana e um domínio citoplasmático. Estruturas denominadas *spikes* (em português = espículas) se projetam externamente na membrana do vírion e são formadas pelo agrupamento de três ectodomínios glicosilados (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011).

O genoma, formado por uma cadeia simples de RNA de sentido negativo, tem aproximadamente 12kb de extensão e consiste de uma sequência líder com cerca de 50 nucleotídeos, seguida por cinco genes de proteínas estruturais na ordem 3'-N-P-M-G-L-5', separados por regiões intergênicas não-transcritas e seguidos por um *trailer* de aproximadamente 70 nucleotídeos (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011, 2018).

Até 1956, acreditava-se que o RABV era antigenicamente único. A descoberta de vírus relacionados à raiva na África (BOULGER, PORTERFIELD, 1958; SHOPE et al., 1970) garantiu a criação do gênero *Lyssavirus* (do grego *lyssa*: raiva) que, pela reatividade antigênica cruzada com soro e anticorpos monoclonais, foi inicialmente dividido em quatro sorotipos (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011; WIKTOR, FLAMAND, KOPROWSKI, 1980; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984): RABV (sorotipo 1), vírus do morcego de Lagos (LBV) (sorotipo 2) (BOULGER, PORTERFIELD, 1958), vírus de Mokola (MOKV) (sorotipo 3) (SHOPE et al., 1970) e vírus de Duvenhage (DUVV) (sorotipo 4) (MEREDITH, ROSSOUW, ROCH, 1971).

Isolamentos de novos lissavírus na Europa, Austrália e Ásia e o extensivo estudo filogenético da diversidade dos vírus relacionados à raiva levaram à utilização do termo “genótipo” (BOURHY, KISSI, TORDO, 1993; INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011) que desde então tem sido amplamente usado na literatura científica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013) e que facilitou a sua posterior classificação em espécies (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011). Os lissavírus podem ainda ser agrupados em filogrupos de acordo com as relações antigênicas e a diversidade de sequências (BADRANE et al., 2001). As espécies do gênero *Lyssavirus*, sua classificação em genótipos e filogrupos e sua distribuição geográfica estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Membros do gênero *Lyssavirus*: classificação em genótipos e filogrupos e distribuição geográfica

Espécie	Genótipo	Filogrupo	Distribuição geográfica
<i>Rabies lyssavirus</i>	1	I	Mundial
<i>Lagos bat lyssavirus</i>	2	II	África
<i>Mokola lyssavirus</i>	3	II	África
<i>Duvenhage lyssavirus</i>	4	I	África
<i>European bat 1 lyssavirus</i>	5	I	Europa
<i>European bat 2 lyssavirus</i>	6	I	Europa
<i>Australian bat lyssavirus</i>	7	I	Austrália
<i>Aravan lyssavirus</i>	?	I	Ásia Central
<i>Khujand lyssavirus</i>	?	I	Ásia Central
<i>Irkut lyssavirus</i>	?	I	Sibéria
<i>West Caucasian bat lyssavirus</i>	?	III?	Cáucaso
<i>Shimoni bat lyssavirus</i>	?	II	África
<i>Ikoma lyssavirus</i>	?	III?	África
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	?	I?	Europa

Fonte: BATISTA, 2011; INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2018; SINGH et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013.

O RABV, que pertence ao genótipo I, é considerado um vírus estável antígenicamente, o que é evidenciado pelo fato de algumas vacinas ainda hoje utilizarem amostras derivadas do vírus isolado por Pasteur no final do século XIX (BATISTA, 2011). Porém, com o advento dos anticorpos monoclonais no final dos anos 70 (WIKTOR, KOPROWSKI, 1978), a ocorrência de variações antigênicas tornou-se evidente, sugerindo ainda uma possível adaptação de determinadas amostras de vírus a um hospedeiro específico (DIETZSCHOLD et al., 1983).

Estas amostras com características antigênicas particulares foram denominadas “variantes” (BATISTA, 2011).

Em 1996, o Instituto Pasteur de São Paulo, Brasil, implementou uma técnica de imunofluorescência indireta usando um painel de 8 anticorpos monoclonais contra a proteína N do RABV, produzido pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), Atlanta, Estados Unidos da América (EUA) e recomendado pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) para estudos de tipificação antigênica de amostras isoladas nas Américas. No Brasil, uma caracterização antigênica realizada com 330 amostras de RABV no território nacional identificou as variantes 2 (encontrada principalmente em cães, apresentando o perfil típico de amostras de raiva urbana), 3 (usualmente identificada em morcegos *D. rotundus*), 4 (identificada em morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*), 5 (relacionada à morcegos hematófagos na Venezuela, mas no Brasil isolada em canídeos selvagens *Cerdocyon thous*), 6 (isolada em morcegos insetívoros *Lasiurus cinereus*) e *Lab* (perfis atípicos que reagiram a todos os anticorpos usados e são provavelmente exemplos de processos adaptativos) (BATISTA, 2011; FAVORETTO et al., 2002).

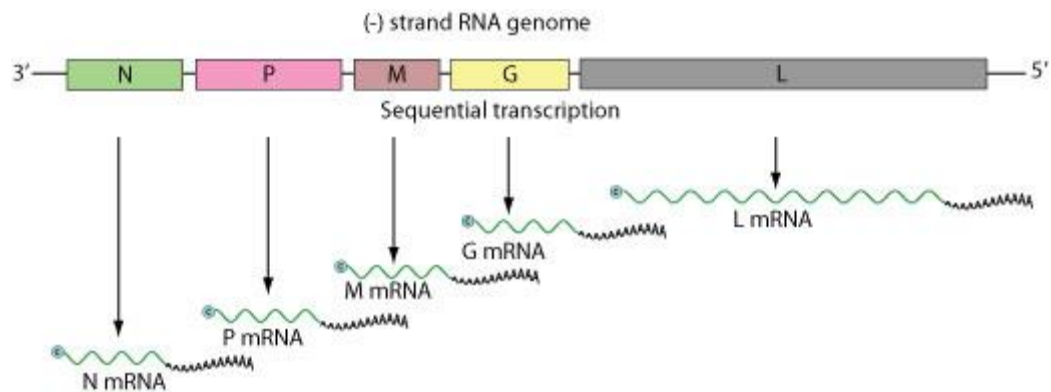
Com a evolução dos métodos moleculares de análise, a caracterização genômica passou a ser empregada nos estudos de análise de variantes (BATISTA, 2011) e revelou que amostras de RABV adaptados à diferentes espécies (variantes) apresentam alterações de genes conservadas que podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos (ARAI et al., 1997; ITO et al., 2001b; 2003; PAEZ et al., 2003). Diante da importância, tanto para a epidemiologia quanto para a patogenia do vírus, a identificação destas variantes genotípicas tem sido o foco da atenção de vários pesquisadores (BATISTA et al., 2009; BERNARDI et al., 2005; CARGNELUTTI et al. 2017; CARNIELI JUNIOR et al., 2012; CASTILHO et al., 2008; DAVID et al., 2007; FAVORETTO et al., 2002; ITO et al., 2001b; 2003; KOBAYASHI et al., 2005; 2006; MOCHIZUKI et al., 2012; QUEIROZ, et al., 2012; SATO et al., 2004).

Estas investigações foram realizadas pelo sequenciamento do gene da proteína N, que é altamente conservado entre os lissavírus, e da glicoproteína G, que é a proteína mais importante para a virulência do RABV e também o principal antígeno responsável pela indução de imunidade protetora no animal (DIETZSCHOLD et al., 1983; SEIF et al., 1985). Uma divergência na sequência de três aminoácidos no gene da proteína N permite agrupar os isolados brasileiros do RABV em dois grupos: RABV relacionados aos canídeos e RABV relacionados aos morcegos hematófagos (ITO, 2001b).

2.2 GENOMA E PROTEÍNAS VIRAIS

O genoma do RABV é constituído de RNA de fita simples, não-segmentado e de sentido negativo. Assim como em todos os vírus RNA de sentido negativo, o genoma é encapsidado pela proteína N viral, não sendo capaz de ser traduzido diretamente em proteínas e, portanto, não é infeccioso. Na amostra fixa *Pasteur virus* (PV), o genoma possui 11.932 nucleotídeos. É codificado do extremo 3' (região amino terminal) para 5' (carboxiterminal), assim como representado no esquema ilustrativo da Figura 1 (WUNNER, 2007).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do genoma do vírus da raiva e RNAs mensageiros



Fonte: https://viralzone.expasy.org/2?outline=all_by_species

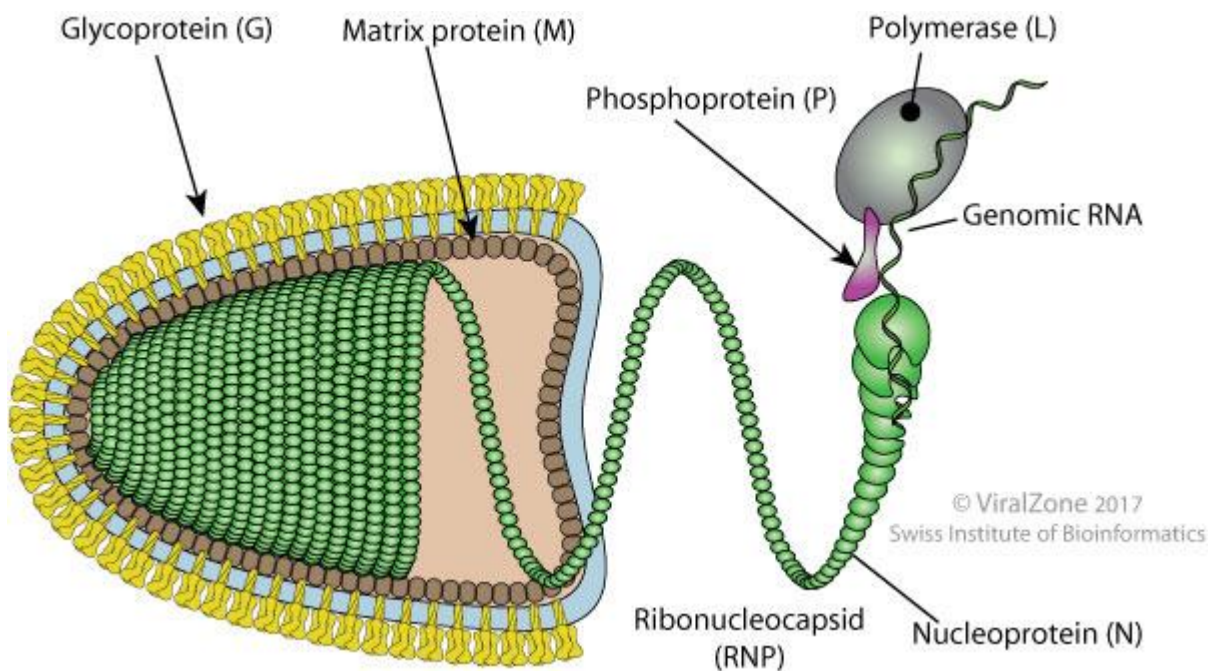
O genoma do RABV possui cinco genes que codificam, nesta ordem, as seguintes proteínas (INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES, 2011):

- Nucleoproteína (N): contém 450 aminoácidos e peso molecular de 58 a 62 quilodaltons (kDa). É a mais conservada entre as proteínas dos lissavírus. Por estar associada ao RNA viral, tem a função de protegê-lo das ribonucleases. Desempenha outras atividades fundamentais como a regulação da transcrição do RNA, participando da encapsidação de novos RNAs sintetizados e do transporte intraneural, via axoplasma;
- Fosfoproteína (P): contém 298 aminoácidos e peso molecular de 35 a 40 kDa. Interage com a nucleoproteína no processo de encapsidação e está envolvida no transporte axonal dos vírus. É a proteína menos conservada entre os lissavírus;
- Proteína da matriz (M): contém 203 aminoácidos e peso molecular de 22 a 25 kDa e está entre o ribonucleocapsídeo e o envelope. É muito importante no brotamento viral e na fase de maturação dos vírus;

- d) Glicoproteína (G): contém 525 aminoácidos e um peso molecular de 65 a 70 kDa. É responsável pela adsorção do vírus à célula, pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, pela estimulação das células T e pela indução de anticorpos neutralizantes, especialmente na sua porção externa (ectodomínio);
- e) RNA polimerase (L): contém 2.128 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 190 kDa. Tem múltiplas atividades enzimáticas: na síntese do RNA, na metilação, na fosforilação e na transcrição do genoma viral juntamente com as proteínas P e N.

As proteínas possuem diferentes formas estruturais e a morfologia de cada uma delas está representada no esquema ilustrativo da Figura 2.

Figura 2 – Esquema ilustrativo da partícula do vírus da raiva, com as respectivas proteínas



Fonte: https://viralzone.expasy.org/2?outline=complete_by_species

2.3 REPLICAÇÃO VIRAL

A replicação do RABV (Figura 3) é iniciada pela adsorção vírus-célula mediada pela glicoproteína G, em uma ligação específica (receptor celular – antirreceptor viral) (PERRIN et al., 1992; SUPERTI et al., 1984; WUNNER, REAGAN, KOPROWSKI, 1984). O vírus penetra nas células por endocitose (LENTZ et al., 1982). Uma vez dentro das células, o

ribonucleocapsídeo é liberado no citoplasma, onde o RNA negativo é transcrito e replicado, dando origem aos RNAs mensageiros (ciclo de transcrição primária), que codificam as 5 proteínas, e aos novos genomas (BANERJEE, 1987), que são encapsidados e, ao nível das membranas celulares, são liberados por brotamento (COX, DIETZSCHOLD, SCHNEIDER, 1977; HUMMELER, KOPROWSKI, WIKTOR, 1967). Este processo pode ser didaticamente dividido em três fases: fase inicial, fase intermediária e fase de maturação e liberação (SCHNELL et al., 2010; WUNNER, 2007).

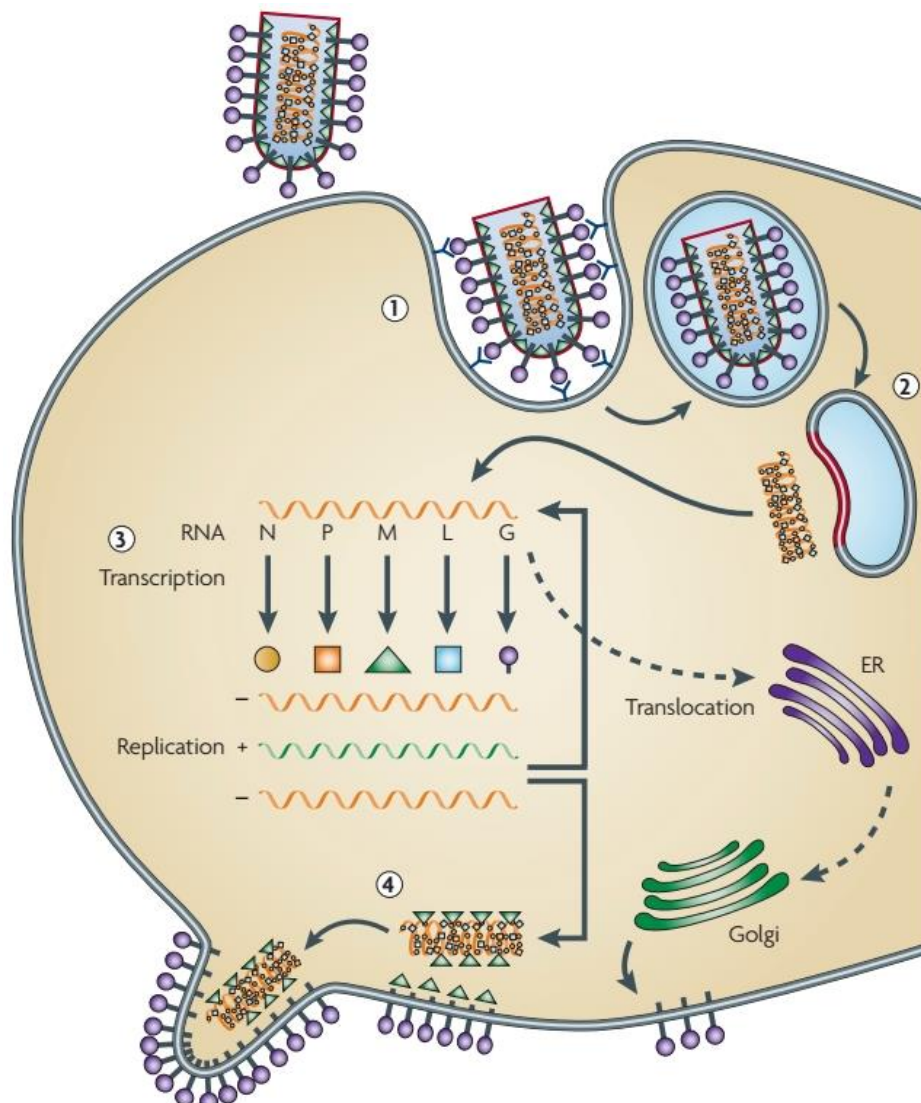
A fase inicial é marcada pela penetração do vírus na célula do hospedeiro e a interação da glicoproteína G do envelope viral com os receptores celulares. Um possível receptor é o de acetilcolina (AChR), encontrado na junção neuromuscular (JNM) que tem a capacidade de acumular partículas virais próximas a estas junções. Porém, pelo fato desse receptor somente ser encontrado nas junções pós-sinápticas das JNM, é difícil considerar que este participe da entrada do vírus nas células (WUNNER, 2007). Outro possível receptor, que também pode atuar na fase inicial da infecção, é o receptor de neurotrofina (p75NTR) também chamado de receptor de baixa afinidade, é um co-receptor para a ligação e penetração do vírus na célula (TUFFEREAU et al., 1998). A molécula de adesão da célula neural (NCAM) também é um possível receptor, que está concentrado nas regiões sinápticas e NMJs, esta molécula foi alvo de estudos em camundongos, e observou-se que quando o gene de codificação desta molécula foi retirado, houve um adiamento do início da manifestação da doença, ou seja, os animais continuaram susceptíveis ao RABV, porém a diminuição de NCAM atrasou o início da infecção (THOULOZE et al., 1998). Nenhum dos receptores descritos anteriormente parece ser essencial e único para os processos de adsorção e penetração do vírus *in vitro*, todavia Schnell et al. (2010) sugerem que o vírus possa utilizar dois tipos de receptores diferentes durante a fase inicial, que atuem de forma complementar, e que provavelmente não exista apenas uma alternativa para que o RABV complete o primeiro estágio do ciclo replicativo.

Após a adsorção, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana celular, evento dependente de pH baixo. Neste momento ocorrem diversas mudanças específicas na conformação da glicoproteína viral. A penetração acontece por endocitose e a liberação da RNP ocorre no citoplasma pela pressão do endossomo (WUNNER, 2007).

Na fase intermediária após a liberação da RNP, o nucleocapsídeo relaxa, formando uma hélice flexível que facilita a sequência de eventos da replicação viral na célula (ISENI et al., 1998). Como o genoma do RABV é constituído de RNA fita simples não segmentado e de sentido negativo, não pode ser traduzido diretamente em proteínas. Logo, o primeiro evento no processo de replicação é a transcrição, a qual irá produzir os RNAs mensageiros (mRNAs)

monocistrônicos (individuais) das cinco proteínas (WUNNER, 2007). O processo de transcrição viral é denominado transcrição primária, uma vez que utiliza o RNA liberado no citoplasma celular e não requer proteínas do hospedeiro, nem a síntese prévia de alguma proteína viral. A transcrição é iniciada por meio da interação do RNA viral complexado com a proteína N com o complexo RNA polimerase RNA dependente (proteína L e cofator proteína P) (SCHNELL et al., 2010; WUNNER, 2007).

Figura 3 – Ciclo replicativo simplificado do vírus da raiva em célula susceptível



Fonte: (SCHNELL et al., 2010).

A primeira fase inclui a ligação e penetração por endocitose (1), seguida pela fusão da membrana viral com a membrana do endossoma que libera/desnuda o genoma viral (2). Na segunda fase, os componentes do vírion são produzidos (transcrição, replicação e síntese proteica) (3). A última fase do ciclo replicativo é a montagem dos componentes virais e o brotamento e liberação dos vírions (4), que podem iniciar um novo ciclo de infecção. ER, retículo endoplasmático.

Os primeiros transcritos de RNA produzidos são os do RNA *Leader* (Le), que iniciam a síntese de mRNA em um mecanismo de “iniciação parada” de transcrição genômica durante o movimento da RNA polimerase pelo genoma a partir do RNA genômico de sentido negativo. Os RNAs Le não se encontram com o *cap* e poliadenilados como é visto nos mRNAs que transcrevem as proteínas (COLONNO, BANERJEE, 1978; LEPPERT et al., 1979). Os cinco mRNAs monocistrônicos são então traduzidos em ordem sequencial nas proteínas virais, gerando um gradiente de produção que segue a sequência $N > P > M > G > L$ (RODRIGUEZ et al., 2012). Este processo envolve os ribossomos celulares, fatores de iniciação e alongação e RNAs transportadores (tRNAs) do hospedeiro. A sequência 3' UUGU-5 no RNA genômico no ponto 3' de cada gene identifica o início da síntese de mRNA. Durante esse período o ponto 5' de mRNA nascente recebe um cap pela proteína L por meio do acréscimo de 7-metil guanosim no nucleotídeo de 5' de mRNA (TESTA, CHANDA, BANERJEE, 1980).

A replicação do genoma é iniciada pela síntese da cópia completa do antígenoma, utilizado como molde para replicação do RNA genômico de sentido negativo. Após este evento são encapsidados, pela nucleoproteína, tanto o genoma quanto o antígenoma. Os mRNAs-N-P-M-L são traduzidos em ribossomos livres no citoplasma, enquanto o mRNA-G é traduzido nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A G nascente é introduzida dentro do lúmen do RER, onde os monômeros sofrem modificações em determinados resíduos de asparagina por meio de glicosilações e processamento de N-glicanos, necessários para a formação dos trímeros, que ocorre no complexo de Golgi pela adição de monossacarídeos por glicosidases e glicotransferases (WUNNER, 2007; SCHNELL et al., 2010).

As fases de maturação e liberação são marcadas pela montagem e egresso das partículas virais. O processo é iniciado pela encapsidação do RNA viral, quando a proteína N é adicionada no final 5' do RNA nascente. Este complexo é responsável pela proteção do genoma viral, contra as ações de endonucleases. Quando as concentrações das proteínas N, P e L atingem um nível ideal na célula infectada, ocorre a formação do nucleocapsídeo. Em seguida a proteína M é associada ao complexo RNP. Esta proteína participa de vários processos relacionados à formação da progênie viral. A proteína M coordena a mudança no balanço entre os processos de transcrição e replicação viral realizado pela RNP viral, transporta a RNP viral condensada até os locais específicos da membrana celular onde estão transpassados os trímeros da glicoproteína viral e estabiliza os trímeros na superfície celular tornando o brotamento mais eficiente. A liberação dos vírions ocorre por brotamento, quando estes, associados à membrana celular, adquirem a camada lipídica (WUNNER, 2007).

2.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

Todos os mamíferos são susceptíveis à infecção pelo RABV e a principal forma de transmissão ocorre pela inoculação do vírus por via percutânea, por mordeduras de animais infectados (TORDO, 1996). O período de incubação da raiva é muito variável após infecções naturais, durando comumente entre 2 a 12 semanas. Diversos fatores podem estar envolvidos no tempo de evolução da infecção, como o local da mordedura, a carga viral presente na ocasião da agressão, a variação na suscetibilidade da espécie envolvida e a imunidade do animal agredido (BATISTA, 2011).

O RABV tem tropismo por neurônios, mas inicia a replicação nas células musculares no sítio de inoculação, por horas ou semanas, até seguir um curso centrípeto, via tecido nervoso periférico, alcançando o sistema nervoso central (SNC), a partir de onde ocorre a disseminação centrífuga do vírus, gerando concentrações de vírus em diversos tecidos (DE MATTOS, C. A., DE MATTOS, C. C., RUPPRECHT, 2001; JACKSON et al., 1999; TSIANG, 1993). A disseminação viral no sistema nervoso resulta da combinação de fluxo axoplásmico retrógrado, transmissão célula-célula via junções sinápticas e passagem direta do vírus através de conexões intercelulares (IWASAKI, 1991). Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmões, músculo cardíaco, mucosas gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais e tecidos neuroepiteliais dos ureteres, bexiga e uretra (CHARLTON, 1988). A replicação do RABV nas glândulas salivares e sua subsequente excreção pela saliva representam o principal mecanismo de disseminação e perpetuação do vírus na natureza (SCHNEIDER, 1991).

Os sinais clínicos de animais e pessoas infectadas pelo RABV decorrem da infecção do SNC e variam desde paralisia (lesões no córtex cerebral) até distúrbios de comportamento (lesões no sistema límbico) (MAYR, GUERREIRO, 1972). São descritas duas formas clássicas de apresentação da doença: a raiva furiosa e a raiva paralítica. Cães geralmente desenvolvem a forma furiosa da raiva, onde tendem a se tornar agressivos, podendo apresentar sinais de depressão, hidrofobia, aerofobia, fotofobia, excitabilidade, incoordenação motora, paralisias musculares e salivação intensa devido à dificuldade de deglutição. Bovinos, suínos, ovinos e equinos desenvolvem mais a forma paralítica da doença, apresentando andar cambaleante, claudicação com paralisia ascendente dos membros inferiores, paralisia do maxilar inferior, dificuldade de deglutição, salivação intensa, ficando incapazes de se movimentar com a evolução da doença devido às lesões medulares, cerebrais e pela paralisia muscular (BATISTA, 2011; CHARLTON, 1988; REBHUN, 2000; RODRIGUEZ et al., 2012). Nas duas formas, a

progressão para a morte é ocasionada por parada respiratória decorrente da alteração em centros nervosos vitais (ITO, MEGID, 2016).

Em humanos, a raiva apresenta muitos aspectos semelhantes aos observados nos animais. Verificam-se comportamentos bizarros, como agitação, ansiedade, insônia, aumento da libido, priapismo, hipersalivação, aerofobia, fotofobia, reação ao barulho, contração muscular, convulsões, alucinações, delírios, confusão mental ou episódios de hidrofobia, hiperestesia, tendência de morder e de mastigar. Com a evolução do quadro, podem ocorrer vocalizações incompreensíveis, paradas cardíacas e respiratórias, paralisias, coma e morte (ITO, MEGID, 2016).

Os principais sinais clínicos em morcegos hematófagos são atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade, agressividade (em alguns casos), falta de coordenação de movimentos, tremores musculares, paralisia e morte. Em morcegos não hematófagos, ocorre paralisia sem agressividade e excitabilidade, sendo os animais encontrados em locais não usuais (ITO, MEGID, 2016). Em outras espécies, a raiva deve ser lembrada sempre que qualquer tipo de comportamento sugestivo de comprometimento neurológico for evidenciado (BATISTA, 2011).

2.5 EPIDEMIOLOGIA E DIVERSIDADE GENÉTICA

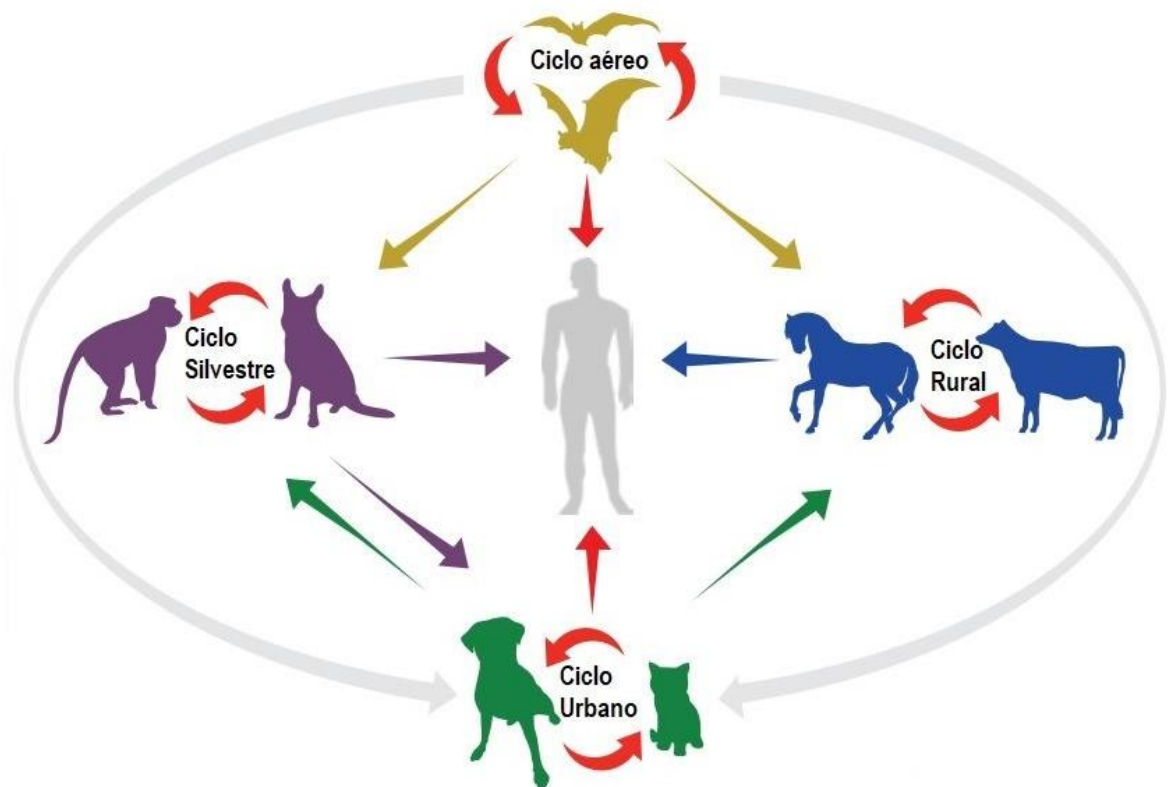
A raiva é uma doença amplamente distribuída, estando presente em todos os continentes, com exceção da Antártica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). É uma doença da lista da OIE e uma das mais mortais zoonoses conhecidas. A cada ano, a raiva mata aproximadamente 59.000 pessoas em todo o mundo, principalmente crianças em países em desenvolvimento (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a, 2019b).

Os principais reservatórios do vírus da raiva na natureza são os membros das ordens *Carnivora* e *Chiroptera*. O RABV está distribuído em todo o mundo em animais domésticos e selvagens, bem como em morcegos nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). No Brasil, a raiva ainda é endêmica e ciclos independentes têm sido identificados em uma variedade de espécies, tais como saguis (*Callithrix jacchus*) (AGUIAR et al., 2011; FAVORETTO et al., 2001), em muitos carnívoros silvestres, como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (BERNARDI et al., 2005; CARNIELI JUNIOR et al., 2006, 2008), e muitas espécies de morcegos (KOTAIT et al., 2007). Os morcegos hematófagos, especialmente *D. rotundus*, são os principais reservatórios do vírus

da raiva na América Latina, sendo os principais transmissores da raiva para os herbívoros (SCHNEIDER et al., 2009).

Desta maneira, no Brasil, o RABV é mantido na natureza por meio de quatro formas distintas de manifestação epidemiológica: urbana, rural, aérea e silvestre (Figura 4). Na cadeia epidemiológica, o humano é hospedeiro final, uma vez que não se caracteriza como transmissor da raiva e pode adquirir a infecção a partir dos reservatórios dos vários ciclos epidemiológicos (ITO, MEGID, 2016).

Figura 4 – Ciclos epidemiológicos da raiva no Brasil



Fonte: (INSTITUTO PASTEUR, 2000).

Os morcegos (ciclo aéreo) são responsáveis pela manutenção da raiva na natureza e a transmitem a herbívoros, humanos, cães, gatos e animais silvestres. Por sua vez, os cães e gatos, principais fontes de infecção no ciclo urbano, são capazes de transmitir aos animais de zona rural e de ciclo silvestre bem como às espécies domésticas e a humanos. Os animais silvestres são responsáveis pela manutenção da raiva em suas espécies e são importantes fontes de infecção para humanos, podendo também transmitir a animais domésticos em determinadas

situações. Os herbívoros, contudo, podem transmitir a raiva para humanos por manipulação, porém o ciclo normalmente está restrito à zona rural (ITO, MEGID, 2016).

Os resultados de tipificação genética e antigênica estão indicando uma alteração no perfil da raiva no Brasil, sendo cada vez menos frequente o achado de casos de raiva canina (*Canis familiaris*) ocasionada pela variante canina (variante 2). Os RABV oriundos dos cães e dos gatos têm apresentado perfil antigênico e genético de vírus que tem o morcego hematófago *D. rotundus* como hospedeiro natural (variante 3). A vacinação sistemática de cães e gatos durante décadas utilizando amostras vacinais de variante canina, além de outras medidas de controle, contribuíram para a exclusão de variantes caninas da população de cães de grandes centros urbanos (ITO, MEGID, 2016), permitindo que o país saísse de um cenário de mais de 1.200 cães positivos para raiva e uma taxa de mortalidade de raiva humana por cães de 0,014/100 mil habitantes em 1999, para um cenário de 09 casos de raiva canina e nenhum registro de raiva humana por cães em 2018. Esse foi o terceiro ano consecutivo sem casos de raiva humana por variante canina no Brasil (BRASIL, 2020b). O RS é considerado área livre de raiva urbana mediada por cães, causada pelas variantes antigênicas 1 e 2, tendo sido o último caso registrado nesta espécie animal em 1988. Em humanos, a doença não é diagnosticada desde 1981 (RIO GRANDE DO SUL, 2020b).

No RS, os principais surtos da doença ocorrem em bovinos devido à transmissão por morcegos hematófagos *D. rotundus*. Segundo o MAPA, de 2005 a 2019 foram registrados 2.270 casos de raiva no RS, sendo 2.064 em bovinos (BRASIL, 2020a). A transmissão da doença está fortemente associada à abundância de morcegos, a concentração de bovinos, a redução do *habitat* do morcego hematófago e alterações climáticas e ambientais que podem causar mudanças nas movimentações dos morcegos na busca por abrigo, alimento e fontes de água (RIO GRANDE DO SUL, 2016).

Os estudos sobre raiva no RS ainda são raros, apesar da importância desta doença, e a caracterização molecular de amostras de RABV tem sido realizada de forma pontual no RS. Schaefer et al. (2005) descreveram a caracterização antigênica e molecular de amostras de RABV do Brasil, onde foram incluídas apenas quatro amostras de RABV isoladas no RS. Já Kanitz et al. (2014) caracterizaram geneticamente amostras de RABV, porém as amostras incluídas neste trabalho foram isoladas de surtos específicos da região central do Estado. Em estudo publicado por Itou et al. (2016) foi descrito um surto de raiva na cidade de Nova Roma do Sul, no ano de 2009, que ocorreu entre os meses de fevereiro e março. Neste trabalho foram identificadas 26 amostras de bovinos positivas para o RABV de linhagem genética característica de morcegos hematófagos *D. rotundus*, em dezenove propriedades rurais. Em um

estudo de Cargnelutti et al. (2017) foram analisadas 61 amostras de RABV de herbívoros, também oriundas principalmente da região central do RS, onde todas apresentaram alta identidade e similaridade com RABV de *D. rotundus* e agruparam em dois *clusters* distintos, indicando que os surtos que ocorreram no RS no período estudado (2012 a 2016) provavelmente envolveram RABV da variante de morcego hematófago de diferentes origens, além de uma possível evolução dos isolados de RABV nesse período.

2.6 DIAGNÓSTICO

A raiva é uma importante zoonose para a qual as técnicas de diagnóstico foram padronizadas a nível internacional. Como não há lesões patognomônicas amplas nem sinais clínicos específicos e constantes para a raiva, o diagnóstico preciso só pode ser feito em laboratório. O teste mais utilizado para o diagnóstico de raiva é o teste de imunofluorescência (FAT), recomendado e considerado o “padrão-ouro” pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e OIE, sendo sensível, específico e barato. Em casos de resultados inconclusivos do FAT, ou em todos os casos de exposição humana, recomenda-se testes adicionais (isolamento de vírus em cultivos celulares ou inoculação em camundongos) (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c).

Além de resultados inconclusivos, a IFA apresenta limitações em tecidos decompostos e o diagnóstico de raiva é muitas vezes confirmado durante o curso da doença (humanos) ou post-mortem. Um diagnóstico rápido e confiável pode ser muito importante para a prevenção em familiares do paciente, profissionais da saúde e em pessoas que entram em contato com animais doentes (FAYE et al., 2017).

Vários testes de diagnóstico molecular, como a detecção de RNA viral por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), reação em cadeia da polimerase associada ao ensaio imunoenzimático (PCR-ELISA), hibridação *in situ* e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) são utilizadas como técnicas adicionais rápidas e sensíveis para o diagnóstico de raiva (FOOKS et al., 2009). Os ensaios de PCR são ferramentas sensíveis para a detecção de RNA derivado de lissavírus em amostras suspeitas, com a vantagem de não exigirem a presença de vírus vivos e podem atingir diferentes genes com diferentes *primers* e também podem ser considerados para uso quando dados de validação adequados forem obtidos (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c).

Considerando algumas desvantagens em termos de carga de trabalho, risco de contaminação e tempo apresentadas pela RT-PCR, alguns testes moleculares em tempo real

visando o gene das proteína N ou L estão sendo desenvolvidos para complementar o diagnóstico convencional de raiva e de vírus relacionados à raiva (COERTSE et al., 2010; DACHEUX et al., 2016; DEUBELBEISS et al., 2014; FAYE et al., 2017; HAYMAN et al., 2011; HOFFMANN et al., 2010; SUIN et al., 2014; WACHARAPLUESADEE et al., 2012; WADHWA et al., 2017; WAKELEY et al., 2005), mas nenhum ainda foi desenvolvido com amostras de RABV do Brasil.

A maioria dos ensaios de RT-qPCR descritos para a detecção de RABV utilizaram o sistema de detecção por sondas de hidrólise (COERTSE et al., 2010; DACHEUX et al., 2016; DEUBELBEISS et al., 2014; FAYE et al., 2017; HOFFMANN et al., 2010; WACHARAPLUESADEE et al., 2012; WADHWA et al., 2017; WAKELEY et al., 2005) e demonstraram serem mais sensíveis que a RT-PCR convencional. Estes ensaios, no entanto, exigiram o número grande de *primers* e sondas para detecção e discriminação do RABV de outros lissavírus.

Apesar da falta de capacidade em diferenciar espécies, estudos que utilizaram o sistema de detecção por corante intercalante (HAYMAN et al., 2011; SUIN et al., 2014) também demonstraram alta sensibilidade e sua simplicidade o torna uma opção atraente para uso laboratorial como ferramenta de vigilância de triagem, permitindo uma análise mais aprofundada pelo sistema por sondas de hidrólise ou exame do produto de qPCR por clonagem e sequenciamento (HAYMAN et al., 2011).

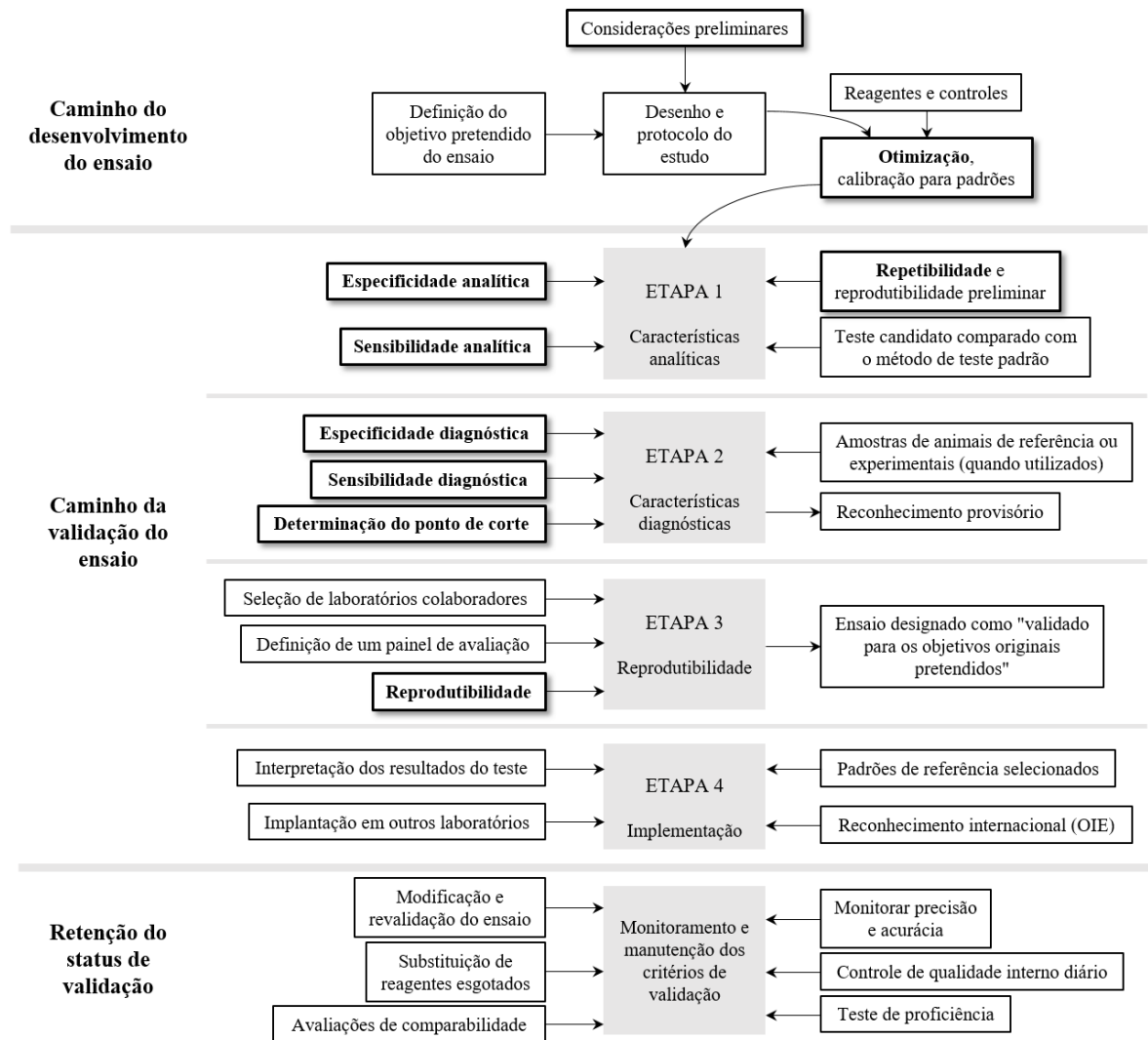
2.6.1 Validação de testes de diagnóstico

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) adotou um padrão formal intitulado “Princípios e Métodos de Validação de Ensaio Diagnósticos para Doenças Infecciosas”, que trata do uso do padrão de validação da OIE e de sua implementação para requisitos específicos, como diferentes tipos de ensaios (incluindo detecção de ácidos nucleicos) e uma elaboração de algumas das ferramentas usadas nos estudos de validação (medição da incerteza, abordagens estatísticas, painéis de referência) (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c).

A validação é um processo que determina a adequação de um ensaio, que foi adequadamente desenvolvido, otimizado e padronizado, para a finalidade pretendida. Todos os ensaios de diagnóstico (ensaio de laboratório e de campo) devem ser validados para as espécies em que serão utilizados. A validação inclui estimativas das características de desempenho analítico e diagnóstico de um teste. Um ensaio que concluiu os três primeiros estágios do

caminho de validação (Figura 5), incluindo a caracterização do desempenho, pode ser designado como "validado para o(s) objetivo(s) original(ais) pretendido(s)" (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c).

Figura 5 – Processo de validação de um teste de diagnóstico segundo o padrão de validação da Organização Mundial de Saúde Animal



Fonte: Adaptação de World Organisation for Animal Health (2019c).

Os ensaios aplicados a indivíduos ou populações têm vários propósitos, como: documentar a ausência de doenças em um país ou região, impedir a propagação de doenças através do comércio, contribuir para a erradicação de uma infecção em uma região ou país, confirmar o diagnóstico de casos clínicos, estimar a prevalência da infecção para facilitar uma análise de risco, identificar os animais infectados em relação à implementação de medidas de

controle e classificar os animais quanto a saúde do rebanho ou o *status* imunológico após a vacinação. Um único ensaio pode ser validado para uma ou mais finalidades pretendidas, otimizando suas características de desempenho para cada finalidade, definindo uma alta sensibilidade de diagnóstico (DSe), com menor especificidade de diagnóstico associada (DSp) para um ensaio de triagem ou, inversamente, definir uma alta DSp com DSe inferior associada para um ensaio confirmatório (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c).

2.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

Uma vez terminado o período de incubação e iniciado o período clínico, não há tratamento específico para a raiva. Alguns pesquisadores apresentaram o conceito de que a raiva é quase sempre fatal, no entanto predomina o conceito de ser sempre fatal em humanos. Casos de cura já foram relatados na literatura, contudo, profissionais experientes dizem não acreditar nessa cura (ITO, MEGID, 2016). No Brasil, o Ministério da Saúde instituiu um protocolo de tratamento da raiva humana baseado na indução de coma profundo, uso de antivirais e outros medicamentos específicos (BRASIL, 2011).

Por causa do risco elevado em expor humanos ao vírus da raiva, o tratamento de animais suspeitos não é aconselhável. Todavia, a profilaxia em pessoas expostas à raiva deve ser imperativo e consiste em lavar o local da mordedura com muita água e sabão e, em seguida, administrar vacina antirrábica potente e segura, conforme preconizado pelas autoridades sanitárias. Também há o recurso de aplicação de soro antirrábico, que confere uma imunidade passiva que persiste por aproximadamente 21 dias (ITO, MEGID, 2016).

A raiva é considerada uma doença prevenível pela vacinação dos animais, que deve ser realizada anualmente, a partir dos 3 meses de idade. Em zonas urbanas, além da vacinação de cães e gatos, a população de animais de rua deve ser reduzida e precisa ser estimulada a posse responsável. É importante não deixar de lado a educação em saúde para que o controle tenha aceitação pela comunidade (ITO, MEGID, 2016). No ambiente rural, para o controle da raiva dos herbívoros, as autoridades sanitárias no Brasil executam atividades regidas pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) que prevê vacinação estratégica de espécies susceptíveis e controle populacional de seu principal transmissor, o *D. rotundus*, além de outras medidas profiláticas e de vigilância (BRASIL, 2009).

2.7.1 Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora (PNCRH)

Desde 1966, o MAPA, por meio da Divisão de Defesa Sanitária Animal, instituiu o Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, que atualmente se denomina Programa Nacional de Controle da Raiva Herbívora (PNCRH), executado pelo Departamento de Saúde Animal, do MAPA. O PNCRH estabelece suas ações visando ao efetivo controle da ocorrência da raiva dos herbívoros no Brasil e não à convivência com a doença. Esse objetivo é alcançado por meio da vacinação estratégica de espécies susceptíveis e do controle populacional de seu principal transmissor, o *D. rotundus*, associados com outras medidas profiláticas e de vigilância (BRASIL, 2009).

Atualmente a legislação federal que aprova as Normas Técnicas para o Controle da Raiva dos Herbívoros no Brasil é a Instrução Normativa Ministerial nº 5, de 1º de março de 2002. Várias Unidades da Federação possuem legislação própria que detalha as ações específicas sobre o programa em nível estadual, em apoio às normas federais. Estas unidades da Federação desenvolvem programas organizados, com ações definidas quanto ao controle da espécie de morcego hematófago (*D. rotundus*), atividades educativas, diagnóstico laboratorial, estímulo à vacinação dos herbívoros domésticos, cadastramento de abrigos e vigilância epidemiológica (BRASIL, 2009).

No RS, entre as ações realizadas para atender ao PNCRH, o Departamento de Defesa Agropecuária da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR) destacou 10 equipes denominadas Núcleos de Controle da Raiva, que são responsáveis pelo controle populacional dos morcegos hematófagos *D. rotundus* (WITT, HOFFMEISTER, 2019). Esse serviço é realizado por meio da captura de morcegos hematófagos, com uso de rede de neblina, aplicação de pasta anticoagulante no dorso desses animais, que, em seguida, são liberados. Cada morcego tratado volta ao seu abrigo, onde outros morcegos da colônia lambem o morcego untado com a pasta. Desse modo, vários morcegos serão intoxicados e mortos (em torno de 20 para cada morcego untado) (ITO, MEGID, 2016; WITT, HOFFMEISTER, 2019).

Estas equipes são acionadas sempre quando há caso confirmado de raiva em herbívoros, quando ocorrem altos índices de mordedura por morcegos hematófagos em animais de produção ou, ainda, se for observado a presença dos morcegos em seus refúgios (WITT, HOFFMEISTER, 2019). Em 2020 existem no RS aproximadamente 2600 refúgios ativos de morcegos hematófagos cadastrados e geo-referenciados pelo Serviço Veterinário Oficial que são revisados pelas Inspetorias de Defesa Agropecuária pelo menos duas vezes por ano (no outono e na primavera) (RIO GRANDE DO SUL, 2020a). Porém, para o sucesso do controle, é imprescindível que a comunidade rural colabore informando, nas Inspetorias de Defesa

Agropecuária, a localização de novos abrigos de morcegos hematófagos (ainda não catalogados) (WITT, HOFFMEISTER, 2019).

3 ARTIGO 1

Sequence analysis of nucleoprotein gene reveals co-circulation of lineages and sublineages of rabies virus in herbivores in Rio Grande do Sul, Brazil

Gisane L. de Almeida^{1,2}, Juliana F. Cargnelutti³, Ananda S. Ries¹, José C. Ferreira², Júlio C. A. Rosa², Helena B. C. R. Batista⁴, Eduardo F. Flores^{3*}, Rudi Weiblen³

(Artigo aceito no periódico *Brazilian Journal of Microbiology*, janeiro de 2020)

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Hospital Veterinário, prédio 97, sala 126, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 97105-900.

²Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Rio Grande do Sul, Av. Getúlio Vargas, 1384, Menino Deus, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 90150-900.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 63A, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 97105-900.

*Corresponding author: Eduardo Furtado Flores, e-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com, phone: +55 55 3220-8055.

⁴Instituto Pasteur, Av. Paulista, 393, Cerqueira César, São Paulo, São Paulo, Brasil, 01311-000.

Abstract

An unprecedented outbreak of rabies occurred in Rio Grande do Sul state (RS) from 2012 onwards, resulting in thousands of bovine deaths, important economic losses and posing risk to human health. This article describes the genetic analyses of 145 rabies virus samples (RABV) recovered from herbivores in the state of Rio Grande do Sul (RS), collected between 2012 and 2017. The analyses were based on partial sequence analyses of the nucleoprotein (*N*) gene. High nucleotide (*nt*) identity (95.5 to 100%) and amino-acid (*aa*) similarity (96.7 to 100%) were observed. The sequences displayed high *nt* identity/*aa* similarity with bovine RABV sequences (96.4 - 97.9%; 98.1 - 100%, respectively) and vampire bat RABV sequences (96.3 – 97.5%; 97.8 – 99.5%) available at GenBank. Phylogenetic analyses based on the *N* sequence allowed segregation of viruses into two distinct *clusters*. *Cluster 1* comprised RABV sequences covering the whole studied period, whereas *cluster 2* consisted of a smaller number of samples which were identified in years 2013 to 2017. On occasions, viruses recovered from the same geographic region and within a short interval were separated into distinct clusters or sub-clusters, indicating co-circulation of distinct lineages. The segregation into *sub-clusters* was also detected when examining viral sequences obtained from the same region at different times, indicating changes in the virus population circulating in particular areas. In summary, partial sequence analyses revealed the circulation of two lineages and different sublineages of RABV in the region.

Keywords: *Rhabdoviridae*, neurological diseases, cattle, genetic characterization, phylogeny.

Introduction

Rabies is a zoonotic disease distributed worldwide, characterized by severe neurological signs of usually fatal outcome in domestic and wild mammals [1]. The disease is caused by rabies virus (RABV), an enveloped, single-stranded RNA virus of negative polarity, belonging to the genus *Lyssavirus*, family *Rhabdoviridae* [2, 3]. The RABV genome contains genes coding for five proteins: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix (M), glycoprotein (G) and polymerase (L) [3]. The N is the main component of the helicoidal nucleocapsid that encapsidates the genomic RNA and plays a role in the temporal transition between transcription and replication of the viral genome during the replicative cycle [4]. The nucleotide (*nt*) sequence of protein N gene is highly conserved among field RABV isolates and, as such, has been largely used for genetic identification of viral lineages, sub-lineages and variants [5-17].

RABV is perpetuated in nature through cycles of infection involving terrestrial carnivores and bats. In South America, the hematophagous bats *Desmodus rotundus* are the main reservoirs and sources of RABV to herbivores [18]. Cattle and horses are frequent targets for *D. rotundus* feeding and, as such, constitute the main herbivorous species affected by rabies [19]. The control of rabies in endemic areas is based on systematic vaccination of susceptible species and control of bat populations [20, 21].

Historically, rabies has affected bovine herds from several Brazilian regions, leading to significant economic losses to the livestock industry [22]. Official data indicates the occurrence of 37.049 cases of rabies in cattle between 1999 and 2017 in the country. In Rio Grande do Sul state (RS), the southernmost Brazilian state, hundreds of cases have been reported in cattle every year, in addition to countless unreported cases. Official data reported 1.990 cases of bovine rabies from 2005 to 2017 [23]. In the last years, in addition to a crescent number of cases, bovine rabies has spread out and extended its geographical range reaching out areas otherwise free of the disease, including neighboring countries Uruguay and Argentina [24]. The high incidence and the geographical spread of rabies has resulted in drastic economic losses to the cattle industry in the affected regions. In addition, the zoonotic potential of RABV requires that people exposed to affected animals search for medical assistance and, frequently, need to be submitted to post-exposure treatment [25]. Official data indicate that 334.956 anti-rabies medical appointments were performed in RS from 2007 to 2017 [26].

Molecular and phylogenetic analysis of RABV isolates involved in field outbreaks have become an important tool to determine the origin of the viruses and to understand the temporal and spatial patterns of dissemination/dispersion of colonies of vampire bats [13, 27, 28]. The

information gathered from some studies has helped to predict future occurrence of cases and, thus, has allowed for the adoption of prevention and control measures [9, 29]. In general, studies of RABV phylogeny and dispersion have been performed through analysis of the complete G gene, G-L intergenic region and/or partial or complete analysis of N gene [9, 30]. In this sense, the N gene has been the preferred target for sequence analysis, since is the most conserved gene among lyssaviruses [31].

Very little information is available on the RABV isolates associated with the recent outbreak reported in RS. The available information is restricted to a few studies analyzing a limited number of viruses, usually originated from restricted areas or outbreaks [29, 32-34]. Thus, the present study aimed at analyzing the N sequences from RABV associated with herbivorous rabies in RS between 2012 and 2017 (77 from this study and 68 obtained from GenBank), trying to identify viral lineages and/or sublineages and to determine possible phylogenetic relationships among the circulating viruses.

Materials and methods

This study included brain samples of cattle (n=74), horses (n=2) and sheep (n=1) from 72 farms located in RS. The samples were submitted to the Virology Section of the Federal University of Santa Maria (SV/UFSM), central RS, and to the *Instituto de Pesquisas Desidério Finamor* (IPVDF), Eldorado do Sul, for diagnosis of rabies between 2012 and 2017. All included samples had been tested positive for RABV in a direct fluorescent antibody test (FAT) and by mouse inoculation test. RABV positive samples were stored at - 20°C until testing. In addition to the produced sequences, 68 sequences originated from other studies deposited in GenBank (29, 33, 34) were included in the analysis, totalizing 145 sequences from RS.

Fragments of cortex, hippocampus, thalamus and medulla of RABV-positive pieces of brains tissue (approximately 100 mg) were macerated and submitted to RNA extraction using Trizol® reagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was diluted in 40 µL of DNase, RNase and pyrogen free water. Total RNA (6 µL) was submitted to *in vitro* transcription for cDNA synthesis, using the reverse transcriptase enzyme from GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Following cDNA synthesis, the products were submitted to a PCR for amplification of a segment within the N protein gene coding sequence. The partial N gene (1284 nt) was amplified with primers: forward ATGTAACACCTCTACAATG [35] and reverse TTGACGAAGATCTTGCTCAT [36]

described previously [37]. Each reaction was performed in a volume of 50 μ l, with 3 μ l of cDNA. Total RNA extracted from RABV negative and positive bovine tissue were used as controls.

PCR products were resolved in a 1.5% agarose gel stained by Gel Red[®] (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under UV light after electrophoresis (70 V, 25 min). For *nt* sequencing, PCR products were purified using QIAquick Purification Kit (Qiagen, Hilde, German). Positive samples were sequenced in duplicates in an automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzes (Applied Biosystems, Foster City, CA), using BigDye reagent. The sequences were analyzed with aid of the Staden program [38] to obtain the consensus sequence. The partial N sequence was determined using the complete RABV N protein sequences available at GenBank database as model. The alignment of the sequences with sequences deposited in GenBank, including nine from Santa Catarina, SC (a neighbor state) [34], 35 from provinces in Argentina (neighbor to RS) [39] and 12 from Uruguay (neighbor to RS) [40], was performed using the program BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite, version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) [41]. Phylogenetic analyses was performed in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software X [42], using the method *Maximum Likelihood* with the model of substitution *General Time Reversible* (GTR) [43] and the confiability was evaluated with *bootstrap* of 1.000 repetitions. The sequences were grouped in *clusters* and *sub-clusters* through topology analyses.

The data from the rabies cases from RS (species, origin/location, year, etc.) were obtained from SV/UFSM files, IPVDF files, *Sistema de Defesa Agropecuária* of SEAPDR and from the literature. The information of the additional sequences was obtained from the literature. The geographic mapping of rabies cases and sequences was performed in Microsoft[®] Excel (2016). Additional information on the analyzed sequences are available on Online Resource 1.

Results

Sequence analysis of N protein gene coding region

The use of primers forward ATGTAACACCTCTACAATG [35] and reverse TTGACGAAGATCTTGCTCAT [36] allowed for the amplification of part of the N gene (1.284 *nt* – residues 67 to 1350) of 77 brain specimens. The alignment of sequences produced in the present study (n=77) with sequences deposited in GenBank (n=68) demonstrated the

presence of several *nt* changes comparing to the standard RABV strain CVS-PV (GenBank access number M13215). Some of these changes were aleatory/random whereas others were frequently identified in each *cluster or sub-cluster*. *Nt* changes in 163 sites distributed randomly over the N coding region were present in all examined sequences, distinguishing them from the standard RABV strain CVS-PV, a RABV originated from carnivorous/dogs. Nonetheless, some *nt* changes were consistently detected according to determined *clusters* and *sub-clusters* and, eventually, determined the segregation of the viruses in the phylogenetic tree (Online Resources 2 and 3). As a whole, most *nt* changes did not result in amino-acid (*aa*) substitutions, with exceptions of sequences of *sub-clusters* 1a-1d and 1h, which presented *aa* changes at residue 50 (Asn→Ser).

The *nt* identity among the sequences varied from 95.5 to 100% and was also high when these sequences were compared with a bovine RABV (96.4 to 97.8%; GU592649) and with a *D. rotundus* RABV (96.3 to 97.5%; GU592648). The *nt* identity dropped to 83.2 to 84.4% when comparing these sequences with a domestic carnivore RABV N sequence (KX148217) (Table 1).

The *nt* sequences converted into predicted *aa* resulted in a sequence of 428 residues (residues 23 to 450). The residue position related to RABV virulence in protein N was determined according to Masatani et al. [44, 45] and Shimizu et al. [46], and revealed a high conservation of N sequence among the field RABV viruses, noticeably in residues involved in virulence. The *aa* similarity of the analyzed region varied from 96.7 to 100%. A high similarity was observed between these sequences and a bovine RABV (98.1 to 100%; GU592649) and a *D. rotundus* RABV deposited in GenBank (97.8 to 99.5%; GU592648). A high similarity was also observed with a domestic carnivore RABV sequence (94.6 to 96.4%; KX148217) (Table 1). No *aa* mutation was observed in the residues of N protein putatively involved in RABV virulence: 273 (Phe), 394 (Tyr) and 395 (Phe) [44-46]. Sequences grouped in *sub-clusters* 1a to 1d and 1h presented a consistent change at residue 50 (Asn→Ser) (Online Resource 4).

Phylogenetic analysis and geographical distribution

The phylogenetic tree built based on N gene demonstrated that all sequences analyzed herein grouped with sequences from herbivorous and vampire bats deposited in GenBank and apart from sequences from carnivores and other wild animals. The herbivorous lineage segregated into two *clusters* (1 and 2), harboring *sub-clusters* (Fig. 1 and 2). This clustering

reflected the *nt* changes observed, in which 11 mutations were present in all sequences from cluster 1 and 25 mutations were present in cluster 2 (Online Resources 1 and 2).

Cluster 1 grouped all viruses from 2012 and 2016, and several sequences from 2013, 2014, 2015 and 2017. *Cluster 2* grouped a lower number of sequences from 2013, 2014, 2015 and 2017, originated from specific RS regions: Porto Vera Cruz and Esperança do Sul (northwestern RS mesoregion), Jaguari and São Pedro do Sul (central-eastern RS mesoregion) and Rolante, Gravataí, Glorinha, Sapiranga, Novo Hamburgo and Três Cachoeiras (metropolitan mesoregion). These findings indicate that viruses from this cluster may have derived from a common ancestor, different from *cluster 1* viruses. All sequences from SC and Uruguay and two sequences from Argentina grouped in *cluster 2*. The rest of Argentinean sequences grouped in *cluster 1*. Figure 3 shows the geographical distribution of the 145 analyzed sequences, according to the respective clusters, along with 770 out of 808 cases of rabies (87.5%) diagnosed in herbivorous in RS from 2012 to 2017.

In some cases, viruses from the same county/municipality obtained within a short period of time (0 days to 2 months) grouped to different *clusters* or *sub-clusters* as observed in sequences from Gravataí/2013 (KX090628) and Glorinha/2013 (KX090618), which grouped in *cluster 1*, whereas the others (KX090603, KX090602, KX090604, KX090605 e KX090601) belonged to *cluster 2*. This segregation was also observed in viruses from São Pedro do Sul/2014 in which one sequence (MN103510) grouped to *cluster 1* and the other two (MN103509 and MN103511) with *cluster 2*.

The segregation of viruses originated from the same location in a short period of time into different *sub-clusters* was observed in sequences from Aceguá/2015 (MN103478 in *sub-cluster 1b* and MN103478 in *sub-cluster 1a*), Gravataí/2013 (KX090603 and KX090604 in *sub-cluster 2b* and KX090605 in *sub-cluster 2d*), Hulha Negra/2015 (KX090622 in *sub-cluster 1b* and KX090623 in *sub-cluster 1c*), Pinhal Grande/2012 (KX090636 in *sub-cluster 1b* and the others in *sub-cluster 1f*) and Rio Pardo/2013 (KX090612 in *sub-cluster 1d* and the other in *sub-cluster 1b*). This pattern of segregation suggest that different RABV (from different bat colonies or divergent within the same colony) were probably involved in these cases/outbreaks.

This segregation was also observed in some sequences obtained in different periods in the same location. RABV sequences from Pinhal Grande/2012 grouped predominantly to *sub-cluster 1f*, whereas sequences from 2015, 2016 and 2017 grouped to *sub-cluster 1a*. Similar segregation was observed for viruses from Caçapava do Sul, which were grouped into distinct *sub-clusters* (2015 and 2017 in *sub-cluster 1b* and 2013 in *sub-cluster 1d*). These findings indicate that distinct RABV were involved in the cases/outbreaks occurring in these locations

at different times, likely reflecting distinct RABV circulating in different bat colonies or, less likely, resulting from virus evolution.

Discussion

Sequence analysis of part of RABV N allowed for the identification of lineages and sublineages, as well their spatial and temporal circulation in RS and nearby areas between 2012 and 2017. This study included an expressive number of sequences (n=145) originated from all RS mesoregions, differing from previous studies which analyzed a limited number of viruses from localized outbreaks and/or from restricted areas [29, 32-34].

Sequence analysis of RABV N protein has been largely used to classify/group isolates according to their genetic lineage, variant, host species, origin and/or geographical distribution [9, 10, 14, 17]. Analysis of RABV N protein from Brazil has led to clustering the isolates into two groups, according to the host species: viruses from dogs/carnivores, belonging to the terrestrial epidemiological cycle, and vampire bats, which together with non-hematophagous bats, form the aerial cycle of the rabies in Brazil [9, 10]. The group of viruses associated with vampire bats could be further divided/classified in subgroups according to their geographic origin [9]. Analysis of N sequence also allowed for the identification of a group of RABV associated with non-hematophagous bats from several Brazilian regions [17].

The results presented herein confirmed the high conservation of the N coding sequence among field RABV isolates [35, 47]. Amino-acid mutations were randomly observed among the analyzed sequences, yet these changes did not keep an evident pattern nor involved the residues associated with RABV virulence. Residues 273 [Phe], 394 [Tyr] and 395 [Phe] are involved in the evasion of the innate immunity and are important for packaging the viral genome [44-46]. A mutation in residue 50 (Asn→Ser) observed in sequences of *sub-clusters* 1a to 1d and 1h and also in sequences recovered from GenBank might lead to structural changes of the N protein and, thereby, may affect the virus biology and pathogenesis [48].

The co-circulation of these RABV lineages and sub-lineages in RS apparently does not pose risk to the efficacy of FAT-based diagnosis since the antibodies used in such assays are generally polyclonal [49]. These reagents are able to recognize/react with different viral proteins and, as such, seems refractory to minor antigen variations as that observed in N residue 50 (Asn→Ser). On the other hand, FAT assays based on monoclonal antibodies (MAbs) and molecular-based techniques are more prone to failure when used in studies applied to an antigenic/genetic diverse population of viruses [50]. Fortunately, this is not apparently the case.

An interesting finding from the phylogenetic analysis was the segregation of viral sequences from the same location in different sub-clusters according to time. These findings indicated that different RABV lineages were associated with outbreaks occurring at different times in the same locations. A given virus associated with an outbreak in 2012 may have suffered mutations with time and/or, more likely, a distinct virus may have been introduced in the region by arrival of new bat colonies [20, 27, 29].

In addition to viral divergence observed with time, some viruses recovered from the same area within a short period (days to months) segregated to distinct *clusters* or *sub-clusters*. These findings indicate a co-circulation of different viral variants in the same region, sharing the same or nearby shelters and/or bat colonies, as described previously in the central mesoregion [29]. On the other hand, the same lineage of RABV may be involved in different outbreaks occurring in the same region in a short period, as described previously in the northeast mesoregion [33].

The identification of two *clusters* and their *sub-clusters* of the vampire bat RABV lineage demonstrate their co-circulation in RS in the examined period. These lineages may have been originated from distinct bat colonies or, alternatively, may have been maintained concomitantly along time in the same bat colonies [29]. These findings reinforce that the development of efficient strategies for the control of bat colonies depends upon the understanding of the dynamics of virus transmission within and between colonies [51]. The efforts for virus elimination or mitigation should be, therefore, coordinated spatially aiming at defining the dynamics of virus transmission within enzootic regions [52].

The present study included sequences obtained from 48 counties, covering all RS mesoregions and comprising a diversity of biomes, including remains of the Atlantic forest and Pampa biomes. This sampling covered a significant area containing many of the approximately 2.600 bat shelters cataloged by the RS Official Veterinary Service and subjected to periodic control of bat populations [54, 55].

Co-circulation of two distinct RABV lineages in RS has already been reported by Fernandes [34] and Cargnelutti et al. [32] testing a smaller number of samples. Our data support and extend these findings indicating that these lineages are likely established in the RS ecosystem. Most of the sequences analyzed in the present study grouped in *cluster 1*, which presented a wide geographic distribution (Fig. 3) and were genetically related to viruses from nearby states (SC) and countries/provinces (Uruguay and Argentina). On the other hand, viruses belonging to *cluster 2* showed a more restrict geographic pattern but were related to sequences from SC and from a neighbor Uruguayan province.

Sequence analysis of RABV has already been used for mapping out the geographic dispersion of isolates [9, 27, 30, 53]. Unfortunately, the data from the present study did not allow for the identification of particular dissemination patterns for each lineage/sub-lineage. Analysis of a larger number of samples recovered from a more comprehensive area during a longer period may be required to achieve such an intent.

Historically, herbivorous rabies related to vampire bats has been endemic in several RS regions, noticeably those presenting environmental conditions to favorably shelter bat populations. Southern municipalities/counties such as Aceguá, Bagé and Caçapava do Sul were historically free of rabies in spite of the presence of vampire bat populations. From 2011 onwards, the occurrence of herbivorous rabies moved southwards, reaching out these regions, close to the Uruguayan border (Fig. 3) [56]. Natural or manmade ecological changes occurring in the last years may have contributed for this dispersion/dissemination, probably by affecting the behavior and dispersion dynamics of bat colonies [20].

In summary, partial sequence analysis of the N gene from RABV recovered from RS (2012-2017) demonstrated a high conservation of this gene/protein, indicated the co-circulation of two lineages and sub-lineages and reinforced the suitability of N sequence to study the genetic relationships among RABV isolates.

Acknowledgements

We thank the *Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul (SEAPDR/RS)* for the leaving period conceded to GLA and for *Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF)* for providing some bovine brains and information concerning the viral sequences; and to Nilton Rossato and Wilson Hoffmeister, coordinators of the Herbivore Rabies Control Program in Rio Grande do Sul, for their support and encouragement for this study.

Funding

EFF and RW are recipients of CNPq fellowships (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). This study was founded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (47337/2014-9).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. World Health Organization (2005) WHO expert consultation on rabies: first report. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43262>. Accessed 19 July 2019
2. International Committee on the Taxonomy of Viruses (2018). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 19 July 2019
3. International Committee on the Taxonomy of Viruses. (2011) ICTV 9th Report. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/201/rhabdoviridae. Accessed 18 July 2019
4. Rodriguez LL, Roehe PM, Batista HBCR, Kurath G (2017) Rhabdoviridae. In: Flores EF (ed) Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas, 3ª ed. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, pp 848-880
5. Batista HBCR, Caldas E, Junqueira DM, Teixeira TF, Ferreira JC, Silva JR, Rosa JCA, Roehe PM (2009) Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. *Acta Sci Vet* 37(4):371-374
6. Castilho JG, Canello FM, Scheffer KC, Achkar SM, Carrieri, ML, Kotait I (2008) Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 50(2):95-99. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652008000200006>
7. David D, Hughes GJ, Yakobson BA, Davidson I, Un H, Aylan O, Kuzmin IV, Rupprecht CE (2007) Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. *J Gen Virol* 88(3):967-980. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82352-0>
8. Ito M, Ito T, Sakai T, Santos MFC, Arai YT, Takasaki T, Kurane I, Ito FH (2001) Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 63(12):1309-1313. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.1309>
9. Ito M, Yohko T, Ito AT, Sakai T, Ito FH, Takasaki T, Kurane I (2001) Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology* 284(2):214-222. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0916>

10. Ito M, Itou T, Shoji Y, Sakai T, Ito FH, Arai YT, Takasaki T, Kurane I (2003) Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Virol* 26(3):317-330. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00048-3)
11. Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EMS, Samara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T (2005) Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci* 67(7):647-652. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.647>
12. Kobayashi Y, Ogawa A, Sato G, Sato T, Itou T, Samara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T (2006) Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J Vet Med Sci* 68(10):1097-1100. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.1097>
13. Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AAB, Albas A, Santos HP, Ito FH, Sakai T (2008) Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Res Notes* 4(44): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-44>
14. Mochizuki N, Kawasaki H, Silva MLCR, Afonso JAB, Itou T, Ito FH, 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. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-32>
15. Queiroz LH, Favoretto SR, Cunha EMS, Campos ACA, Lopes MC, Carvalho C, Iamamoto K, Araújo DB, Venditti LLR, Ribeiro ES, Pedro WA, Durigon EL (2012) Rabies in southeast Brazil: A change in the epidemiological pattern. *Arch Virol* 157(1):93-105. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1146-1>
16. Romijn PC, Heide RVD, Cattaneo CAM, Silva RCF, Van Der Poel WHM (2003) Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69(1):81–86.
17. Schaefer R, Batista HBR, Franco AC, Rijsewijk FAM, Roehle PM (2005) Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet Microbiol* 107:161–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.023>
18. Banyard AC, Hayman D, Johnson N, McElhinney L, Fooks AR (2011) Bats and lyssaviruses. *Adv Virus Res* 79:239-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>
19. Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E (2005) Overview of rabies in the Americas. *Virus Res* 111(1): 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.006>

20. Johnson N, Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setien A (2014) Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses* 6(5): 1911–1928. <https://doi.org/10.3390/v6051911>
21. Mayen F (2003) Haematophagous bats in Brazil: their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J Vet Med* 50(10):469–472. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00713.x>
22. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (2013) Ações de controle da raiva dos herbívoros no Brasil. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/DADOSRAIVAATE2015.pdf> Accessed 23 July 2019
23. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (2019) Coordenação de Informação e Epidemiologia – Saúde Animal SIZ/CIEP/CGPZ/DSA/SDA. <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>. Accessed 23 July 2019
24. World Organisation for Animal Health (2019) Disease distribution maps, World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) – Version 1. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap. Accessed 23 July 2019
25. Ministério da Saúde do Brasil (2014) Normas técnicas de prolixia da raiva humana. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/Normas-tecnicas-profilaxia-raiva.pdf>. Accessed 23 July 2019
26. Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul (2018) Situação epidemiológica/dados. Raiva humana. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201809/18124231-dados-atendimento-antirrabico-pagina-cevs-09-2018.pdf> Accessed 23 July 2019
27. Carnieli Jr P, Castilho JG, Fahl WO, Vêras NMC, Timenetsky MCST (2009) Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. *Virus Res* 144(1-2):215-224. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.001>
28. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, Souza V, Castillo A, Franka R, Escalante-Mañe M, Sauri-González I, Rupprecht CE. (2006) Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. *J Clin Microbiol* 44(5):1697–1710. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1697-1710.2006>
29. Kanitz FA, Kowalski AP, Batista HBCH, Carnieli Jr P, Oliveira RN, Weiblen R, Flores EF (2014) Molecular epidemiology of an outbreak of bovine rabies in central Rio Grande do

- Sul, Brazil, 2012. *Cienc Rural* 44(5): 834-840. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000500012>
30. Sato G, Itou T, Shoji Y, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I, Samara SI, Carvalho AA, Nociti DP, Ito FH, Sakai T (2004) Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. *J Vet Med Sci* 66(7): 747–753. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.747>
 31. Wunner WH (2007) Rabies Virus. In: Jackson AC, Wunner WH (ed) *Rabies*, 2nd edn. Academic Press, Cambridge, pp 23-69. <https://doi.org/10.1016/B978-012369366-2/50004-X>
 32. Cargnelutti JF, Quadros JM, Martins M, Batista, HBCR, Weiblen R, Flores EF (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. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3533-8>
 33. Itou T, Fukayama T, Mochizuki N, Kobayashi Y, Deberaldini ER, Carvalho Adolorata AB, Ito FH, Sakai T (2016) Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than a month in Rio Grande do Sul in southern Brazil. *BMC Res Notes* 9(87). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1898-5>
 34. Fernandes MES (2016) Sequenciamento e análise filogenética do gene da nucleoproteína de vírus da raiva isolados de bovinos nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Dissertation, Universidade Federal do ABC
 35. Bourhy H, Kissi B, Tordo N (1993) Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194:70-91. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1236>
 36. Smith JS (1995) Rabies Virus. In: Murray PR (ed) *Manual of Clinical Microbiology*, 6th edn. ASM Press, Washington, pp 997-1003
 37. Carnieli Jr P, Fahl WO, Castilho JG, Oliveira RN, Macedo CI, Durymanova E, Jorge RSP, Morato RG, Spíndola RO, Machado LM, Sá JEU, Carrieri ML, Kotait I (2008) Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Res* 131(1):33-46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.08.007>
 38. Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:233–241. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>
 39. Torres C, Lema C, Gury Dohmen F, Beltran F, Novaro L, Russo S., Freire MC, Velasco-Villa A, Mbayed VA, Cisterna DM (2014) Phylodynamics of vampire bat-transmitted rabies in Argentina. *Mol Ecol* 23(9):2340-2352. <https://doi.org/10.1111/mec.12728>

40. Guarino H, Castilho JG, Souto J, Oliveira RN, Carrieri ML, Kotait I (2013) Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Res* 173(2):415-420. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.013>
41. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
42. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
43. Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York
44. Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Abe M, Yamaoka S, Sugiyama M (2011) Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res* 155(1):168-174. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.016>
45. Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Sawaki Y, Koyama H, Sugiyama M (2010) Rabies Virus Nucleoprotein Functions to Evade Activation of the RIG-I-Mediated Antiviral Response. *J Virol* 84(8):4002-4012. <https://doi.org/10.1128/JVI.02220-09>
46. Shimizu K, Ito N, Mita T, Yamada K, Hosokawa-Muto J, Sugiyama M, Minamoto N (2007) Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res* 123(2):154-160. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.08.011>
47. Cleveland SB, Davies J, McClure MA (2011) A Bioinformatics Approach to the Structure, Function, and Evolution of the Nucleoprotein of the Order Mononegavirales. *PLoS One* 6(5):e19275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019275>
48. Albertini AAV, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RBG, Clapier CR, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RWH (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313(5785):360-363. <https://doi.org/10.1126/science.1125280>
49. World Organisation for Animal Health (2008) OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.1.13. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/2.01.13_RABIES.pdf. Accessed 23 July 2019
50. Batista HBCR, Schmidt E, Caldas E, Massunaga P, Teixeira TF, Schaefer R, Roehe PM (2008) Caracterização de amostras do vírus da raiva, isoladas nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, com anticorpos monoclonais antilissavírus. *Arq Bras Med Vet Zootec* 60(1):260-262. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000100036>

51. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK (2002) Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis* 8(12):1468-1473. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010317>
52. Blackwood JC, Streicker DG, Altizer S, Rohani P (2013) Resolving the roles of immunity, pathogenesis, and immigration for rabies persistence in vampire bats. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(51):20837–20842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308817110>
53. Carnieli Jr P, Castilho JG, Fahl WO, Vêras NMC, Carrieri ML, Kotait I (2009) Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. *Virus Res* 141(1):81-89. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.015>
54. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul (2016) Relatório raiva bovina 2011 – jun 2016. <http://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02110534-see-relatorio-raiva-bovina-v-3.pdf>. Accessed 23 July 2019.
55. Wiit, AA, Hoffmeister, W (2019) O desafio do controle da população de morcegos hematófagos no Rio Grande do Sul - o papel dos Núcleos de Controle da Raiva. *Informativo Técnico DDA* 8(2):1-16. <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201905/07102842-it-desafio-no-controle-de-morcegos-hematofagos-no-rs.pdf>. Accessed 12 May 2019.
56. Rodenbusch CR, Ferreira JC, Rosa JCA, Migliavacca VF, Bertagnolli AC, Peres ME, Almeida LL (2016) Spatial and Temporal Description of Laboratory Diagnosis of Bovine Rabies in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Sci Vet* 44:1411.

Table 1 – Nucleotide and amino acid identity in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivore species in Rio Grande do Sul state, Brazil, compared to domestic carnivore RABV sequence (GenBank access KX148217), bovine RABV sequence (GU592649), *Desmodus rotundus* RABV sequence (GU592648) and among the sequences this study.

Identity (%)	Domestic carnivore RABV	Bovine RABV	<i>Desmodus rotundus</i> RABV	Among the sequences
Nucleotide	83.2 to 84.4	96.4 to 97.8	96.3 to 97.5	95.5 to 100
Amino acid	94.6 to 96.4	98.1 to 100	97.8 to 99.5	96.7 to 100

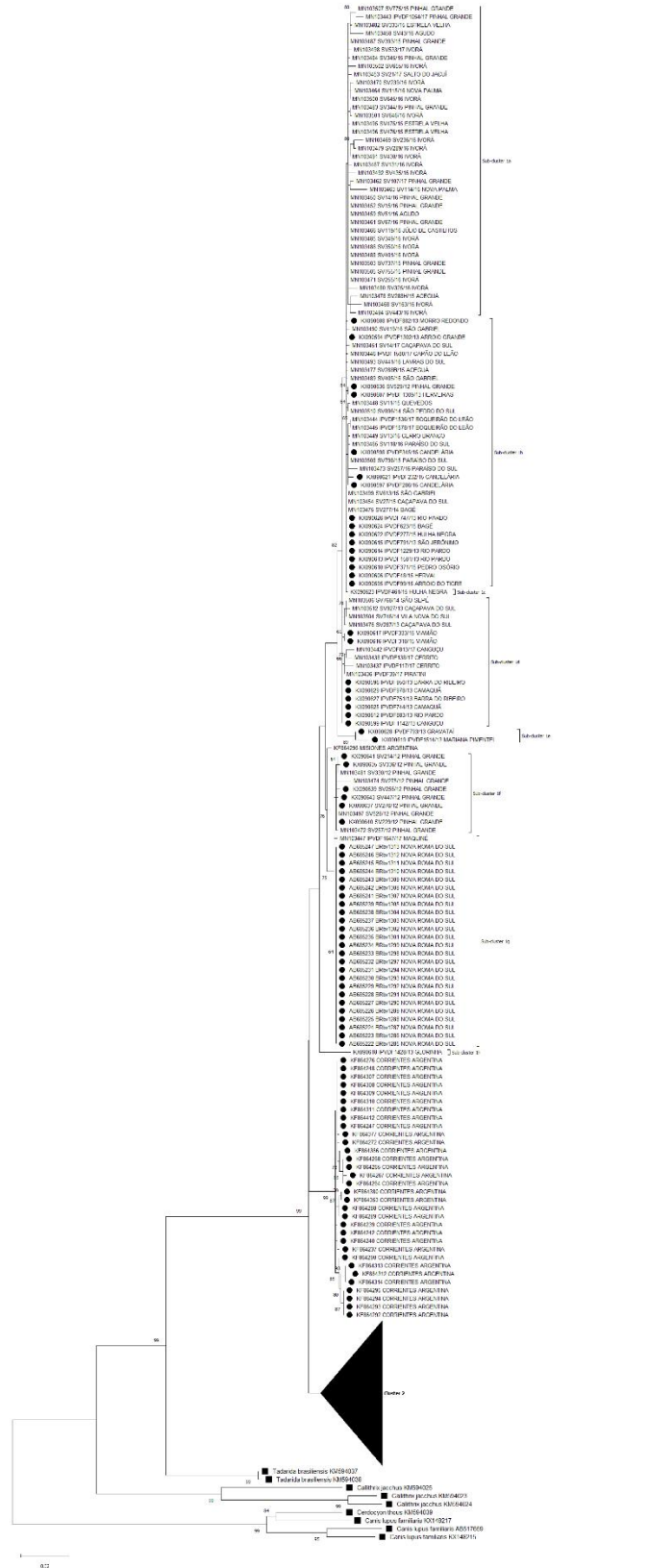


Fig. 1 Phylogenetic tree with Cluster 2 compressed constructed by the Maximum Likelihood method with the General Time Reversible (GTR) substitution model of RABV N gene partial sequences recovered from herbivores in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (●, RABV from herbivores and vampire bats obtained from GenBank; ■, RABV from carnivores and wild animals obtained from GenBank)

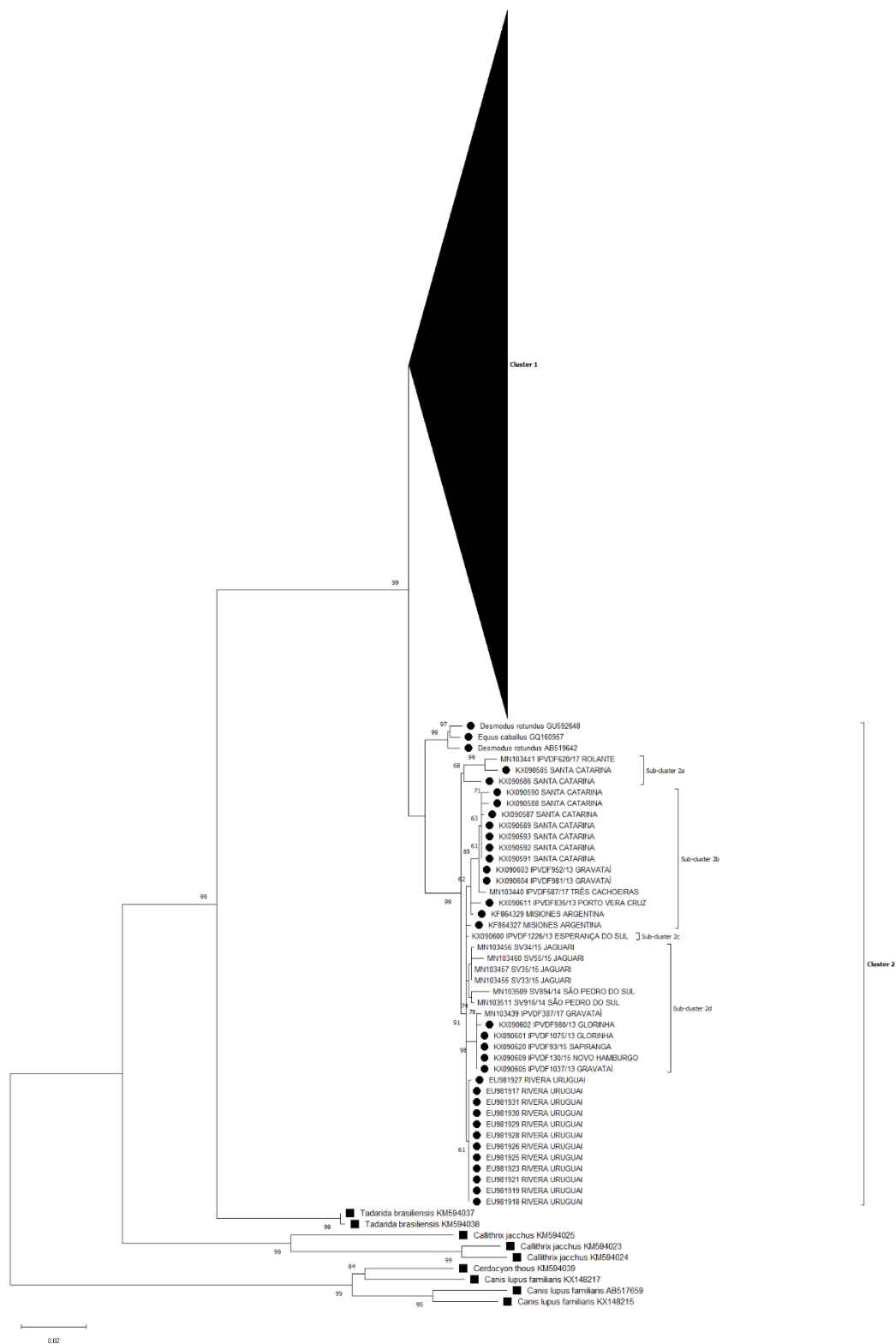


Fig. 2 Phylogenetic tree with Cluster 1 compressed constructed by the Maximum Likelihood method with the General Time Reversible (GTR) substitution model of RABV N gene partial sequences recovered from herbivores in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (●, RABV from herbivores and vampire bats obtained from GenBank; ■, RABV from carnivores and wild animals obtained from GenBank)

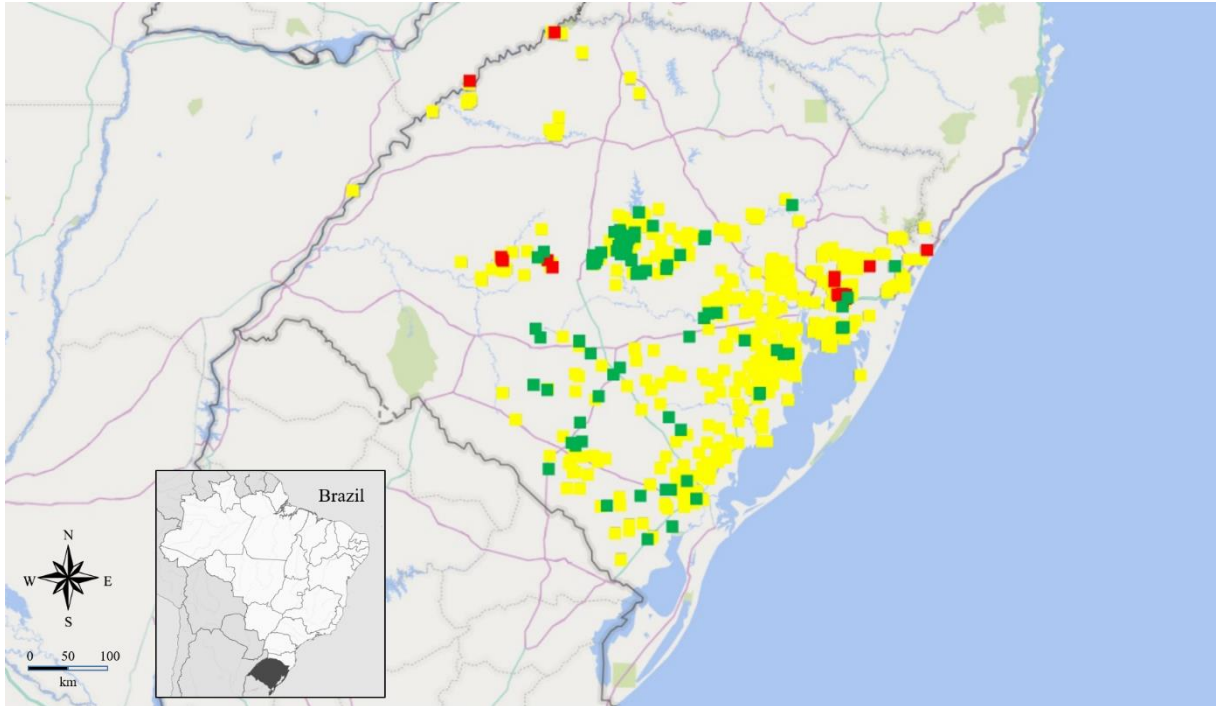


Fig. 3 Cases/outbreaks of herbivorous rabies in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Farms that had viruses grouped in cluster 1 in the phylogenetic tree are highlighted in green and farms that had viruses in cluster 2 are in red. Farms where the rabies diagnosis was performed by the immunofluorescence test, biological test or RT-PCR from 2012 to 2017 but whose N sequences were not obtained are highlighted in yellow

Online Resource 1

Identification, animal species, location, geographical coordinates, year and GenBank accession number of rabies virus introduced in this work:

Identification	Species	Origin	Geographical coordinates		Year	GenBank accession	References
SV214/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,290277	-53,263333	2012	KX090641	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV229/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,313333	-53,258055	2012	KX090640	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV256/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,340972	-53,299444	2012	KX090639	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV257/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,318444	-53,277833	2012	MN103472	This study
SV275/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,312500	-53,240833	2012	MN103474	This study
SV276/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,312500	-53,240833	2012	KX090637	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV330/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,290055	-53,261916	2012	MN103481	This study
SV336/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brasil	-29,313611	-53,280833	2012	KX090635	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV447/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,317833	-53,265944	2012	KX090643	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016
SV528/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,307583	-53,251305	2012	MN103497	This study
SV529/12	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,338833	-53,299166	2012	KX090636	Kanitz et al, 2014; Fernandes, 2016

SV287/13	Bovine	Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,616944	-53,396111	2013	MN103476	This study
SV927/13	Bovine	Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,550555	-53,324444	2013	MN103512	This study
IPVDF744/13	Bovine	Camaquã, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,791916	-51,775777	2013	KX090625	Fernandes, 2016
IPVDF747/13	Bovine	Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,027194	-52,253194	2013	KX090626	Fernandes, 2016
IPVDF751/13	Bovine	Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,420331	-51,458820	2013	KX090627	Fernandes, 2016
IPVDF791/13	Bovine	São Jerônimo, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,292666	-51,944027	2013	KX090615	Fernandes, 2016
IPVDF793/13	Bovine	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,969194	-50,862750	2013	KX090628	Fernandes, 2016
IPVDF835/13	Bovine	Porto Vera Cruz, Rio Grande do Sul, Brazil	-27,789000	-54,985666	2013	KX090611	Fernandes, 2016
IPVDF882/13	Bovine	Morro Redondo, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,621888	-52,582194	2013	KX090608	Fernandes, 2016
IPVDF883/13	Bovine	Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,257222	-52,557111	2013	KX090612	Fernandes, 2016
IPVDF950/13	Bovine	Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,423836	-51,514943	2013	KX090596	Fernandes, 2016
IPVDF952/13	Bovine	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,852166	-50,918527	2013	KX090603	Fernandes, 2016
IPVDF978/13	Bovine	Camaquã, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,805194	-51,780333	2013	KX090629	Fernandes, 2016
IPVDF980/13	Bovine	Glorinha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,894444	-50,827777	2013	KX090602	Fernandes, 2016
IPVDF981/13	Bovine	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,865027	-50,908666	2013	KX090604	Fernandes, 2016

IPVDF1037/13	Bovine	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,914583	-50,860083	2013	KX090605	Fernandes, 2016
IPVDF1075/13	Bovine	Glorinha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,855222	-50,822277	2013	KX090601	Fernandes, 2016
IPVDF1142/13	Bovine	Canguçu, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,021277	-52,782944	2013	KX090599	Fernandes, 2016
IPVDF1226/13	Bovine	Esperança do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-27,313694	-54,048083	2013	KX090600	Fernandes, 2016
IPVDF1229/13	Bovine	Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,034583	-52,344722	2013	KX090614	Fernandes, 2016
IPVDF1302/13	Bovine	Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-32,169277	-53,019277	2013	KX090594	Fernandes, 2016
IPVDF1309/13	Bovine	Herveiras, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,475222	-52,659361	2013	KX090607	Fernandes, 2016
IPVDF1428/13	Bovine	Glorinha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,882777	-50,806527	2013	KX090618	Fernandes, 2016
IPVDF1514/13	Bovine	Mariana Pimentel, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,384194	-51,587833	2013	KX090619	Fernandes, 2016
IPVDF1581/13	Bovine	Rio Pardo, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,079166	-52,392777	2013	KX090613	Fernandes, 2016
SV277/14	Bovine	Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,071277	-53,766666	2014	MN103475	This study
SV746/14	Bovine	Vila Nova do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,295305	-53,773861	2014	MN103504	This study
SV768/14	Bovine	São Sepé, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,303305	-53,775500	2014	MN103506	This study
SV894/14	Bovine	São Pedro do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,593027	-54,069944	2014	MN103509	This study
SV896/14	Bovine	São Pedro do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,497861	-54,232305	2014	MN103510	This study

SV916/14	Bovine	São Pedro do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,524722	-54,124083	2014	MN103511	This study
SV11/15	Bovine	Quevedos, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,442500	-54,166944	2015	MN103448	This study
SV27/15	Bovine	Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,823277	-53,560333	2015	MN103454	This study
SV33/15	Bovine	Jaguari, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,504305	-54,631638	2015	MN103455	This study
SV34/15	Bovine	Jaguari, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,530138	-54,620083	2015	MN103456	This study
SV35/15	Bovine	Jaguari, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,514722	-54,630805	2015	MN103457	This study
SV55/15	Bovine	Jaguari, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,494138	-54,639833	2015	MN103460	This study
SV288B/15	Bovine	Aceguá, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,510555	-54,111944	2015	MN103477	This study
SV288H/15	Bovine	Aceguá, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,510555	-54,111944	2015	MN103478	This study
SV333/15	Bovine	Estrela Velha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,316111	-53,228333	2015	MN103482	This study
SV344/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,344222	-53,281333	2015	MN103483	This study
SV345/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,344222	-53,281333	2015	MN103484	This study
SV393/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,358777	-53,244305	2015	MN103487	This study
SV475/15	Bovine	Estrela Velha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,300000	-53,162777	2015	MN103495	This study
SV476/15	Bovine	Estrela Velha, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,258861	-53,160250	2015	MN103496	This study

SV613/15	Bovine	São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,714861	-54,279333	2015	MN103499	This study
SV737/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,252527	-53,384916	2015	MN103503	This study
SV755/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,271944	-53,318333	2015	MN103505	This study
SV775/15	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,311888	-53,253750	2015	MN103507	This study
SV798/15	Bovine	Paraíso do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,655333	-53,088666	2015	MN103508	This study
IPVDF48/15	Bovine	Herval, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,855777	-53,467805	2015	KX090606	Fernandes, 2016
IPVDF93/15	Bovine	Sapiranga, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,685361	-50,949499	2015	KX090620	Fernandes, 2016
IPVDF99/15	Bovine	Arroio do Tigre, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,194166	-52,958611	2015	KX090595	Fernandes, 2016
IPVDF130/15	Bovine	Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,727527	-50,953305	2015	KX090609	Fernandes, 2016
IPVDF232/15	Bovine	Candelária, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,573388	-52,801611	2015	KX090621	Fernandes, 2016
IPVDF277/15	Bovine	Hulha Negra, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,291444	-53,815500	2015	KX090622	Fernandes, 2016
IPVDF310/15	Bovine	Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,172777	-50,869861	2015	KX090616	Fernandes, 2016
IPVDF333/15	Bovine	Viamão, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,167083	-50,850500	2015	KX090617	Fernandes, 2016
IPVDF345/15	Bovine	Candelária, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,610000	-52,808583	2015	KX090598	Fernandes, 2016
IPVDF371/15	Bovine	Pedro Osório, Rio Grande do Sul, Brazil	-32,050777	-52,744111	2015	KX090610	Fernandes, 2016

IPVDF286/15	Bovine	Candelária, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,604388	-52,810722	2015	KX090597	Fernandes, 2016
IPVDF461/15	Bovine	Hulha Negra, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,263333	-53,860833	2015	KX090623	Fernandes, 2016
IPVDF623/15	Bovine	Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,250777	-53,745500	2015	KX090624	Fernandes, 2016
SV13/16	Bovine	Cerro Branco, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,624944	-53,035416	2016	MN103449	This study
SV14/16	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,311888	-53,25375	2016	MN103450	This study
SV15/16	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,407222	-53,252777	2016	MN103452	This study
SV43/16	Bovine	Agudo, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,526194	-53,195166	2016	MN103458	This study
SV51/16	Sheep	Agudo, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,516611	-53,200055	2016	MN103459	This study
SV67/16	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,387472	-53,338000	2016	MN103461	This study
SV114/16	Bovine	Nova Palma, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,467777	-53,314361	2016	MN103463	This study
SV115/16	Bovine	Nova Palma, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,431972	-53,360444	2016	MN103464	This study
SV118/16	Bovine	Paraíso do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,656472	-53,141972	2016	MN103465	This study
SV119/16	Bovine	Júlio De Castilhos, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,450694	-53,532111	2016	MN103466	This study
SV131/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,479916	-53,573055	2016	MN103467	This study
SV163/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,479916	-53,573055	2016	MN103468	This study
SV236/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,477138	-53,620444	2016	MN103469	This study

SV239/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,488111	-53,585722	2016	MN103470	This study
SV255/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,488111	-53,585722	2016	MN103471	This study
SV257/16	Bovine	Paraíso do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,634833	-53,129416	2016	MN103473	This study
SV289/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,514222	-53,629194	2016	MN103479	This study
SV325/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,525833	-53,601500	2016	MN103480	This study
SV349/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,518361	-53,579916	2016	MN103485	This study
SV350/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,490805	-53,616611	2016	MN103486	This study
SV401/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,536472	-53,623833	2016	MN103488	This study
SV405/16	Bovine	São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,179910	-54,256470	2016	MN103489	This study
SV419/16	Bovine	São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,264780	-54,205070	2016	MN103490	This study
SV430/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,552805	-53,605027	2016	MN103491	This study
SV435/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,477749	-53,620083	2016	MN103492	This study
SV441/16	Bovine	Lavras do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,762500	-54,128055	2016	MN103493	This study
SV443/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,542666	-53,599166	2016	MN103494	This study
SV645/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,476805	-53,596750	2016	MN103500	This study
SV646/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,525833	-53,601500	2016	MN103501	This study
SV655/16	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,561222	-53,630833	2016	MN103502	This study
SV14/17	Bovine	Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	-30,416305	-53,648305	2017	MN103451	This study
SV21/17	Equine	Salto do Jacuí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,064055	-53,113888	2017	MN103453	This study

SV107/17	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,299777	-53,282000	2017	MN103462	This study
IPVDF39/17	Bovine	Piratini, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,762694	-53,096916	2017	MN103436	This study
IPVDF117/17	Bovine	Cerrito, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,705916	-52,816916	2017	MN103437	This study
IPVDF138/17	Bovine	Cerrito, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,705000	-52,758888	2017	MN103438	This study
IPVDF387/17	Equine	Gravataí, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,847555	-50,866194	2017	MN103439	This study
SV533/17	Bovine	Ivorá, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,534444	-53,624833	2017	MN103498	This study
IPVDF587/17	Bovine	Três Cachoeiras, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,427416	-49,927222	2017	MN103440	This study
IPVDF620/17	Bovine	Rolante, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,583944	-50,561305	2017	MN103441	This study
IPVDF813/17	Bovine	Canguçu, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,141277	-52,651277	2017	MN103442	This study
IPVDF1054/17	Bovine	Pinhal Grande, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,235277	-53,325388	2017	MN103443	This study
IPVDF1536/17	Bovine	Boqueirão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,321361	-52,392333	2017	MN103444	This study
IPVDF1578/17	Bovine	Boqueirão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,291638	-52,380472	2017	MN103445	This study
IPVDF1580/17	Bovine	Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil	-31,789361	-52,478527	2017	MN103446	This study
IPVDF1647/17	Bovine	Maquiné, Rio Grande do Sul, Brazil	-29,582416	-50,282583	2017	MN103447	This study
BRbv1313	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685247	Itou et al., 2016

BRbv1312	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685246	Itou et al., 2016
BRbv1311	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685245	Itou et al., 2016
BRbv1310	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685244	Itou et al., 2016
BRbv1309	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685243	Itou et al., 2016
BRbv1308	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685242	Itou et al., 2016
BRbv1307	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685241	Itou et al., 2016
BRbv1305	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685239	Itou et al., 2016
BRbv1304	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685238	Itou et al., 2016
BRbv1303	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685237	Itou et al., 2016
BRbv1302	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685236	Itou et al., 2016
BRbv1301	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685235	Itou et al., 2016
BRbv1299	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685234	Itou et al., 2016
BRbv1298	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685233	Itou et al., 2016
BRbv1297	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685232	Itou et al., 2016
BRbv1294	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685231	Itou et al., 2016

BRbv1293	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685230	Itou et al., 2016
BRbv1292	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685229	Itou et al., 2016
BRbv1291	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685228	Itou et al., 2016
BRbv1290	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685227	Itou et al., 2016
BRbv1289	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685226	Itou et al., 2016
BRbv1288	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685225	Itou et al., 2016
BRbv1287	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685224	Itou et al., 2016
BRbv1286	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685223	Itou et al., 2016
BRbv1285	Bovine	Nova Roma do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil	Unknown	Unknown	2009	AB685222	Itou et al., 2016

Online Resource 2

Nucleotide changes observed in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivorous species in Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighbor regions, grouped in *cluster 1*, when compared to CVS-PV sequence (standard RABV, GenBank access M13215):

Nucleotide position	<i>cluster 1</i>	<i>sub-cluster 1a</i>	<i>sub-cluster 1b</i>	<i>sub-cluster 1c</i>	<i>sub-cluster 1d</i>	<i>sub-cluster 1e</i>	<i>sub-cluster 1g</i>	<i>sub-cluster 1h</i>	<i>sub-cluster 1i</i>
120		T → C	T → C	T → C	T → C				T → C
149		A → G	A → G	A → G	A → G				A → G
171						A → G			
183		C → T	C → T	C → T	C → T		C → T	C → T	C → T
195		T → A	T → C	T → C	T → C		T → C	T → C	T → C
231		A → G	A → G	A → G	A → G		A → G	A → G	A → G
303		T → C	T → C	T → C	T → C		T → C	T → C	T → C
312		C → T	C → T	C → T	C → T		C → T	C → T	C → T
342						T → C			
384						G → A			
429						T → C			
438								T → C	
441	G → A								
462				C → T					
465		G → A	G → A	G → A	G → A	G → A			G → A
519						T → C			
540		A → G	A → G	A → G	A → G	A → G			A → G
567	A → G								
582	T → C								
616	T → C								
633		C → T	C → T	C → T	C → T				
651									T → A
654	G → A								
660	A → G								
663									T → C
669	A → T								
769		A → T	A → T	A → T	A → T	A → T	A → C	A → C	A → C
789		G → A	G → A	G → A					G → A
840					T → A	T → A			
852	T → C								
858									C → T
867									C → T
897		T → G	T → G	T → G	T → G	T → G	T → G	T → G	
906	A → C								
975									A → G
1005		T → G	T → G	T → G	T → G	T → G		T → G	T → G
1023		A → C	A → C	A → C	A → C	A → C	A → T	A → T	A → T

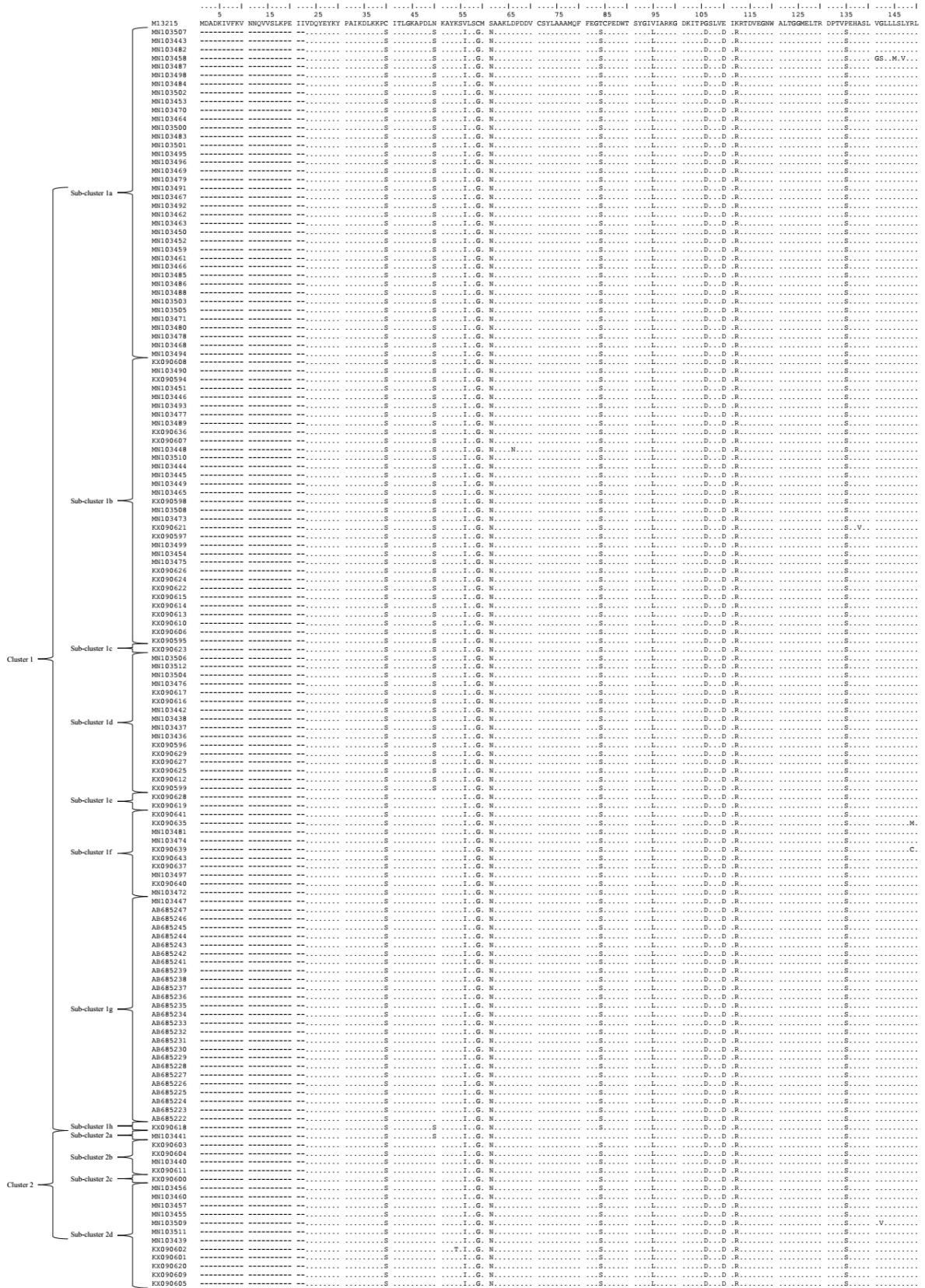
Online Resource 3

Nucleotide changes observed in the partial sequence of nucleoprotein of RABV recovered from cases of rabies in herbivorous species in Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighbor regions, grouped in cluster 2, when compared to CVS-PV sequence (standard RABV, GenBank access M13215):

Nucleotide position	<i>cluster 2</i>	<i>sub-cluster 2a</i>	<i>sub-cluster 2b</i>	<i>sub-cluster 2c</i>	<i>sub-cluster 2d</i>
145				T → C	
171	A → G				
195		T → C			
342	T → C				
441		G → A		G → A	G → A
462	C → T				
465	G → A				
519	T → C				
540	A → G				
543	C → T				
567	A → T				
576			A → G		
654	G → A				
658	C → T				
660	A → G				
663			T → C	T → C	T → C
669		A → C	A → T	A → T	A → T
744	A → G				
769	A → C				
774	A → G				
858	C → T				
867	C → T				
906	A → C				
975	A → G				
1005	T → G				
1023	A → T				
1086	T → C				
1161			C → T		
1203			T → C		
1206	G → A				
1221	T → A				
1248	G → A				
1317	C → T				
1350		A → G		A → G	A → G

Online Resource 4

Amino acid alignment of herbivorous RABV nucleoprotein partial sequences (position 23 to 150)



4 ARTIGO 2**An RT-qPCR assay for rapid diagnosis of rabies in cattle**

Gisane L. de Almeida^{a,c}, Franciele L. Monteiro^a, Ingrid Merchioratto^a, Ana Paula G. Mortari^a,
Juliana F. Cargnelutti^b, Eduardo F. Flores^{b,*}, Rudi Weiblen^b

(Artigo submetido ao periódico *Journal of Virological Methods*, janeiro de 2020)

^aPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Hospital Veterinário, prédio 97, sala 126, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 97105-900.

^bDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 63A, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, 97105-900.

*Corresponding author: Eduardo Furtado Flores, e-mail: eduardofurtadoflores@gmail.com, phone: +55 55 3220-8055.

^cSecretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, Rio Grande do Sul, Av. Getúlio Vargas, 1384, Menino Deus, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 90150-900.

Summary

Rabies is endemic in most Brazilian regions housing commercial bovine herds, including Rio Grande do Sul state (RS). A rapid, high-quality and high-precision complementary assay for the diagnostic of the disease is of pivotal importance. We herein describe the development and validation of a real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) for diagnostics of rabies in cattle. The primers were designed targeting a highly conserved region of the nucleoprotein (N) gene of RABV samples obtained from cattle in RS. The detection limit of the assay corresponded to 12.99 DNA copies and the intra- and inter-run repeatability was adequate. Nonspecific amplification of other pathogens causing neurological disease in cattle in RS or cross-contamination were not detected. Bovine brain samples from suspect cases of rabies (n=21) were tested by the new RABV RT-qPCR and by the gold-standard fluorescent antibody test (FAT) and the sensitivity and specificity of the RT-qPCR assay were determined. Both the sensitivity and specificity of the RT-qPCR were 100%. The RABV RT-qPCR assay provides for high-throughput analysis of samples, and is both analytically and diagnostically sensitive and specific. Thus, this assay may be very useful for a rapid, sensitive and specific diagnosis of rabies in cattle.

Keywords: rabies diagnostic, herbivorous rabies, RT-qPCR, rabies, cattle.

1. Introduction

Rabies lyssavirus (RABV), a member of the genus *Lyssavirus*, family *Rhabdoviridae*, order *Mononegavirales*, is the agent of rabies, a zoonotic disease distributed worldwide. The disease is characterized by severe neurological signs, generally fatal in domestic and wild mammals (International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2018; World Health Organization, 2005). RABV is perpetuated in nature through cycles of infection involving terrestrial carnivores and bats. In South America, the hematophagous bats *Desmodus rotundus* are the main reservoirs and sources of RABV to herbivorous (Banyard et al., 2011). In Brazil, six antigenic variants were typified by means of a monoclonal antibody panel against the viral nucleoprotein: numbers 2 (dog), 3 (*Desmodus rotundus*), 4 (*Tadarida brasiliensis*), 5 (vampire bat from Venezuela), 6 (*Lasiurus cinereus*) and Lab (reacted to all used antibodies) (Favoretto et al., 2002).

Rabies is one of the deadliest zoonoses. Each year, rabies kills nearly 59,000 people worldwide, mostly children in developing countries (World Organisation for Animal Health, 2019a; 2019b). Considering only bovine rabies, the disease is estimated to cause annual losses of hundreds of millions of dollars in Latin America, mainly due to the deaths of thousands of cattle. In addition, high indirect expenses involve vaccination of millions of cattle and thousands of post-exposure treatments (serovaccination) of persons having contact with suspect animals (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009).

The RABV genome consists of a single-stranded RNA of negative polarity, encoding five proteins: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), matrix (M), glycoprotein (G) and polymerase (L) (International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2011). The nucleotide (nt) sequence of protein N gene is highly conserved among RABV isolates. Due to this property, this protein/gene has been used as basis for several assays based on antigen (Rahmadane et al. 2017; Ahmed et al., 2012; Madhusudana et al., 2012; 2004; Caporale et al., 2009; Nishizono et al., 2008; Perrin et al., 1992), antibody (Realegeno et al., 2018; Dyer et al., 2013; Sugiyama et al., 1997; Esterhuysen et al., 1995) and nucleic-acid detection (Naji et al., 2019; Dedkov et al., 2018; Faye et al., 2017; Wadhwa et al. 2017; AravindhBabu et al., 2014; 2012; Hoffmann et al., 2010; Nadin-Davis et al., 2009; Wacharapluesadee et al., 2008; Macedo et al., 2006; Black et al., 2002; Soares et al., 2002; Sacramento et al., 1991).

At least six reverse transcriptase/quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assays targeting the RABV N gene have been described (Dedkov et al., 2018; Faye et al., 2017; Wadhwa et al. 2017; Hoffmann et al., 2010; Nadin-Davis et al., 2009; Wacharapluesadee et al., 2008). However, the performance of these assays has only been evaluated using TaqMan or

other RT-qPCR probes, and tested a limited number of samples from natural cases of herbivorous rabies. In addition, most of the described assays do not follow the validation process prescribed by the OIE (World Organisation for Animal Health, 2019c).

Thus, the aim of this study was to determine the diagnostic accuracy of an optimized and well-characterized SYBR green-based RT-qPCR assay for detection of RABV variant 3 in bovine samples, following the guidelines of the validation process prescribed by the OIE and comparing to the fluorescent antibody test (FAT), the gold standard. This assay would be useful in endemic areas of bovine rabies for the following purposes: (1) to confirm the diagnosis of suspect clinical cases in cattle and (2) for conducting epidemiological investigations of outbreaks where a large number of samples need to be analyzed concomitantly.

2. Materials and Methods

2.1. Study design

The development of RABV RT-qPCR in cattle started with primer and positive control (synthetic DNA) design based on the bovine RABV N gene. Then, the assay linear range and efficiency of the test were determined. For validation, the analytical characteristics (analytical sensitivity, intra- and inter-run variability, analytical specificity and cross-contamination risks) were evaluated using positive control designed. Diagnostic properties (sensitivity and specificity) were evaluated using positive and negative bovine brain samples in the conventional diagnosis of rabies (fluorescent antibody test – FAT). The results obtained in RT-qPCR were compared with those of the FAT, the gold standard.

2.2. Design of primers and positive-control for RABV variant 3

The RABV N gene was selected as the target based on its high conservation and the sequences available in GenBank. Complete and partial sequences of N gene of RABV from samples from cattle of Rio Grande do Sul, Brazil, were obtained from the database and served as the basis for primer design. The primers were designed using the Primer Quest Tool (available on-line at <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) in accordance with the current guidelines regarding primers for qPCR techniques (Thornton and Basu, 2011; Raymaekers et al., 2009). These primers are: forward CACTGCGAGAGAAGCACTATTA and reverse CAAGCCCAATGAACGGAAATG. To determine their detection spectrum, the primers were analyzed *in silico* with 68 RABV isolates sequences from Rio Grande do Sul cattle as well as the 198 housekeeping genes available from GenBank.

The positive control was composed by a synthetic 410-bp DNA corresponding to a partial sequence of the RABV N gene (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA

Technologies). gBlocks DNA was quantified using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and 1 ng/ μ l solution was diluted in a brain matrix cDNA solution produced with total RNA extracted from bovine brain negative to RABV, in a series of 10-fold (1:10; v:v) until reaching 10^{-5} dilution, constituting the positive control. Total RNA extraction was performed using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and cDNA confection using the GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, United States), both according to the manufacturer's instructions. For internal control, the forward primers TGACCCCTTCATTGACCTTC and reverse CGTTCTCTGCCTTGACTGTG were chosen, previously used by Ashley et al. (2011) for detection of bovine GAPDH sequences. Primers and gBlocks were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, United States). DNase/RNase-free water was used as a negative control.

2.3. Reaction mixture and amplification mode

The qPCR assay was performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), using the default thermocycler program for all genes: 10 min of pre-incubation at 95°C followed by 40 cycles for 15 sec at 95°C and one min at 60°C. Individual qPCR reactions were carried out in 20 μ l volumes in a 96-well plate containing 7.2 μ l of DNase/RNase-free water, 10 μ l of Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.4 μ l of each primer and 2 μ l of the cDNA sample. At the end of each reaction melting curves were acquired and analyzed.

2.4. Determination of assay linear range e efficiency

The linear range of the entire assay was determined using the synthetic DNA-negative cDNA prepared at an initial concentration of 1 ng/ μ l in a series (6) of 10-fold (1:10; v:v) dilutions. Each dilution was tested 6 times in a single run. PCR efficiencies were determined by the formula: PCR efficiency (%) = $100 \times (10^{1/\text{slope}} - 1)$.

2.5. Analytical sensitivity (limit of detection) e intra- and inter-run variability

A tenfold dilution series consisting of 15 separate dilutions was made using the synthetic DNA-negative cDNA prepared at an initial concentration of 1 ng/ μ l and which was examined 6 times in each of 5 independent runs and tested by RABV RT-qPCR analysis. The results of these analyses were used to calculate the detection limit (i.e. input concentration giving a positive RT-qPCR result in 95% of the repeats (Burns and Valdivia, 2008). The copy number of the synthetic DNA-negative cDNA solution was estimated through the formula: number of copies = (amount of DNA in ng \times 6.022×10^{23}) / (length of template in bp \times $1 \times 10^9 \times$ 650).

The inter-run, intra-run and total standard deviations (SD) were calculated by the formulas: inter-run SD, standard deviation of the means of all runs; intra-run SD, mean of the

standard deviations of all runs; total SD, standard deviation of all replicates. The total coefficient of variation (CV) was calculated by the formula: total CV = total SD / (mean Cq-value of all replicates).

2.6. Analytical specificity

The analytical specificity was assessed using bovine brains infected by pathogens which cause similar neurological signs in RS, Brazil: 1 positive for RABV, 1 positive for *Bovine alphaherpesvirus 5* (BoHV-5) and 1 positive for babesiosis. Samples were tested by RABV RT-qPCR in triplicates, along with positive and negative controls.

2.7. Assessment of cross-contamination risks

To confirm the absence of cross-contamination in the assay, 24 RABV positive control and 72 negative control wells (DNase, RNase-free water) were arranged in a chequerboard pattern (Fang et al., 2007) and evaluated for cross-contamination by RABV RT-qPCR analysis on two different days. All procedures were performed in complete accordance with good molecular diagnostics laboratory practice.

2.8. Diagnostic sensitivity and specificity

The sensitivity and specificity of the RABV RT-qPCR were evaluated using 21 bovine brain samples of known infection status (RABV positive x RABV negative), considering diagnostic sensitivity (DSe) and specificity (DSp) estimates of 98%, with an error of 5% margin allowed in estimate of DSe and DSp and a confidence of 90% (World Organisation for Animal Health, 2019c). Thus, 10 RABV positive and 11 RABV negative brains were tested in parallel by the fluorescent antibody test (FAT) and by the RABV RT-qPCR. All samples used in this study have been sent to routine rabies diagnosis and were stored at -20°C until processing. RNA extraction from the samples was performed by the Trizol method and cDNA was produced using the Promega Kit. Samples were then analyzed in triplicate on RABV RT-qPCR along with negative and positive controls. The FAT was performed using a FITC anti-RABV conjugate provided by Pasteur Institute (São Paulo, Brazil). Negative and positive samples at RABV RT-qPCR and FAT were cross-tabulated the categorical test results in a 2 × 2 table, according the World Organisation for Animal Health (2019c). The DSe was calculated by the formula: total positive (TP)/(TP + false negatives (FN)), and the DSp was calculated by formula: total negative (TN)/(TN + false positives (FP)).

3. Results

3.1 Determination of assay linear range e efficiency

Linear regression analysis demonstrated that the RABV RT-qPCR had a linear range extending from the 10^{-5} dilution to the 10^0 dilution of the positive control with an $R^2 > 0.99$. Based on the slope, the efficiency of the assay was calculated to be 95.165% (Fig. 1).

3.2 Analytical sensitivity (detection limit) and intra- and inter-run variability

The limit of detection (i.e. input concentration giving a positive result in 95% of the replicates) was determined by probit analysis to be at a dilution of 1.82×10^{-9} , which corresponded to 12.99 DNA copies and Cq of 34.08. The mean results and the variations for each dilution are summarized in Table 1.

Both intra- and inter-run standard deviations (SD) were low with maxima at 1.30 Cq and 2.71 Cq, respectively. The coefficient of variation (CV) ranged from 1.46% to 8.46%, indicating low variation between different repetitions and different runs. The CV increased towards and beyond the limit of detection. The mean Cq for the RABV RT-qPCR assay was 22.81 ± 0.47 over the 25 runs of the 15 dilutions of positive control.

3.3 Analytical specificity

One bovine brain diagnosed positive to RABV, one positive to BoHV-5 and one positive for babesiosis, were tested by RABV RT-qPCR. No false-positive or false-negative results were obtained (not shown).

3.4 Assessment of cross-contamination risks

The positive control samples on the chequerboard plate yielded mean Cq values of 18.01 ± 0.42 . No false positive results were recorded in each of the two runs, and no cross-contamination was detected.

3.5 Diagnostic sensitivity and specificity

The results of the RABV RT-qPCR and FAT for the rabies-suspect cattle (clinically suspicious) are summarized in Table 2. No false-positive or false-negative results were obtained. Consequently, the evaluated diagnostic sensitivity and specificity using 21 bovine brain samples of known infection status, considering DSe and DSp estimates of 98%, with an error of 5% margin allowed in estimate of DSe and DSp and a confidence of 90%, according the World Organisation for Animal Health (2019c), were both 100%. Estimates of the sensitivity and specificity of the RABV RT-qPCR are summarized in Fig. 2.

4. Discussion

In spite of a number of RABV nucleic-acid based diagnostic assays developed (Naji et al., 2019; Dedkov et al., 2018; Faye et al., 2017; Wadhwa et al. 2017; Aravindh Babu et al., 2014, 2012; Hoffmann et al., 2010; Nadin-Davis et al., 2009; Wacharapluesadee et al., 2008;

Macedo et al., 2006; Black et al., 2002; Soares et al., 2002; Sacramento et al., 1991), none has been validated for detection of RABV in bovine samples. In addition, the primer design was performed based on RABV sequences circulating in Southern Brazil. Thus, this study provides important information regarding the diagnosis of bovine rabies, especially in regions where it is endemic as RS state (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019).

The extraction system and cDNA synthesis protocol used in this study resulted in an efficient sample processing according to the manual system used previously (Naji et al., 2019; Wadhwa et al., 2017) and did not increase nucleic acid cross-contamination. The incorporation of a manual nucleic acid extraction system into the assay substantially reduced the costs, since the Trizol reagent/method may be concomitantly used in other laboratory protocols.

The assay is specific to RABV variant 3, usually identified in *Desmodus rotundus*, and in brains of cattle with rabies. However, due to the high conservation of the N gene in lyssaviruses (International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2011), the assay is likely to detect other RABV variants and viruses of this genus in other samples as well. *In silico*, primers yielded products when tested on partial nucleoprotein gene sequences from sheep, swine, *Desmodus rotundus*, horse, *Tadarida brasiliensis*, *Cerdocyon thous*, cat and dog (GenBank accession numbers AB623079, KF864261, AB297635, FJ649186, GU552784, KR781591, AB263299 and AB083797, respectively) (not shown).

The RABV RT-qPCR described here is unique amongst previously published studies in that it has been designed using sequences from several field RABV circulating in cattle in RS, Brazil. This assay also incorporates a proprietary synthetic positive control to verify proper functioning of the reaction components. The linear range, efficiency and limit of detection for this assay were similar to that described previously for other RT-qPCRs for RABV (Dedkov et al., 2018; Faye et al., 2017; Wadhwa et al., 2017; Hoffmann et al., 2010; Nadin-Davis et al., 2009; Wacharapluesadee et al., 2008). The intra- and inter-run repeatability for the RABV component of the assay was adequate, with CVs of less than 9% in all dilutions, and were similar to those reported previously for other assays for detection of RABV (Faye et al., 2017).

The assay was shown to be also highly specific, detecting RABV and no other pathogens causing neurological syndromes in cattle in RS state, Brazil. The diagnostic sensitivity and specificity of the RABV RT-qPCR was both estimated to be 100% (sensitivity: 72.2 to 100%; specificity: 74.1 to 100%) using 21 bovine brain samples of known infection status, considering DSe and DSp estimates of 98%, with an error of 5% margin allowed in estimate of DSe and DSp and a confidence of 90%, according the World Organisation for Animal Health (2019c).

The results of this study confirm that the sensitivity of the RABV RT-qPCR described is similar to FAT, which is considered the gold standard for RABV diagnosis.

The severe nature of rabies and the implications of false negative or inconclusive results justify the need of a complementary diagnostic assay for confirmation of the diagnosis with higher accuracy. Usually, the FAT is the gold standard used in most diagnostic laboratories. Complementary diagnostic tests – e.g. virus isolation (VI) in cell cultures and mouse inoculation test (MIT) are frequently used in cases of inconclusive results and/or in cases where the clinical and epidemiological findings are very suggestive of rabies, but the FAT yields negative results, among others. The biological tests (VI and MIT) recommended by the OIE may take 2 to 4 (VI) or 5 to 28 days (MIT) to get the final results (World Organisation for Animal Health, 2019c). In addition, MIT faces another problem since concerns about ethics in animal use has become an emergent issue. In addition, post-exposure treatment is frequently recommended in cases of human exposure to suspect animals, requiring a prompt and definitive result. Hence, the use of a RABV RT-qPCR standardized and validated for bovine samples may bring more agility to get the final diagnosis of rabies in cattle, especially in inconclusive cases. In addition, the development of rapid and suitable molecular diagnostic tools for large-scale detection of RABV may be important for routine diagnostic testing and epidemiological surveillance, particularly in RS, Brazil, where herbivorous rabies remains endemic (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019).

In summary, a high-throughput, analytically and diagnostically sensitive and specific RT-qPCR assay for RABV detection in bovine brains is described. This assay may be useful for confirmatory diagnosis of bovine rabies.

Funding

EFF and RW are recipients of CNPq fellowships (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). This study was founded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements

We thank the *Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Rio Grande do Sul* (SEAPDR/RS) for the leaving period conceded to GLA and to Nilton Rossato and Wilson Hoffmeister, coordinators of the Herbivore Rabies Control Program in Rio Grande do Sul, for their support and encouragement for this study.

References

- Ahmed, K., Wimalaratne, O., Dahal, N., Khawplod, P., Nanayakkara, S., Rinzin, K., Perera, D., Karunanayake, D., Matsumoto, T., Nishizono, A., 2012. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86(4), 736–740. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0332>
- AravindhBabu, R.P., Manoharan, S., Ramadass, P., 2014. Diagnostic evaluation of RT-PCR–ELISA for the detection of rabies virus. *Virus Dis.* 25(1),120–124. <https://doi.org/10.1007/s13337-013-0184-6>.
- AravindhBabu, R.P., Manoharan, S., Ramadass, P., Chandran, N.D.J., 2012. Evaluation of RT-PCR assay for routine laboratory diagnosis of rabies in post mortem brain samples from different species of animals. *Indian J. Virol.* 23(3), 392–396. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0109-9>.
- Banyard, A.C., Hayman, D., Johnson, N., McElhinney, L., Fooks, A.R., 2011. Bats and lyssaviruses. *Adv. Virus Res.* 79, 239-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>.
- Batista, H.B.C.R., 2011. Caracterização antigênica e molecular de isolados e desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra o vírus da raiva. Thesis – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Black, E.M., Lowings, J.P., Smith, J., Heaton, P.R., McElhinney, L.M., 2002. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. *J. Virol. Methods* 105, 25-35. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00062-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00062-9).
- Burns, M., Valdivia, H., 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur. Food. Res. Technol.* 226, 1513–1524. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0683-z>.
- Caporale, G.M.M., Silva, A.C.R., Peixoto, Z.M.P., Chaves, L.B., Carrieri, M.L., Vassão, R.C., 2009. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. *J. Clin. Lab. Anal.* 23, 7-13. <https://doi.org/10.1002/jcla.20275>.

- Dedkov, V. G., Deviatkin, A.A., Poleshchuk, E.M., Safonova, M.V., Blinova, E.A., Shchelkanov, M.Y., Sidorov, G.N., Simonova, E.G., Shipulin, G.A., 2018. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 90(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.009>.
- Dyer, J.L., Niezgoda, M., Orciari, L.A., Yager, P.A., Ellison, J.A., Rupprecht, C.E., 2013. Evaluation of an indirect rapid immunohistochemistry test for the differentiation of rabies virus variants. *J. Virol. Methods* 190, 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.009>.
- Esterhuysen, J.J., Prehaud, C., Thomson, G.R., 1995. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J. Virol. Methods* 51, 31-42. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00098-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00098-2).
- Fang, X., Willis, R.C., Burrell, A., Evans, K., Hoang, Q., Xu, W., Bounpheng, M., 2007. Automation of nucleic acid isolation on kingfisher magnetic particle processors. *JALA Charlottesville, Va.* 12, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2007.05.001>.
- Favoretto, S.R., Carrieri, M.L., Cunha, E.M.S., Aguiar, E.A.C., Silva, L.H.Q., Sodré, M.M., Souza, M.C.A.M., Kotait, I., 2002. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 44(2), 91-95. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000200007>.
- Faye, M., Dacheux, L., Weidmann, M., Diop, S.A., Loucoubar, C., Bourhy, H., Sall, A.A., Faye, O., 2017. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J. Virol. Methods* 243, 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.019>.
- Hoffmann, B., Freuling, C.M., Wakeley, P.R., Rasmussen, T.B., Leech, S., Fooks, A.R., Beer, M., Müller, T., 2010. Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR “double check” strategy. *J. Clin. Microbiol.* 48(11), 3970-3978. <https://doi.org/10.1128/JCM.00612-10>.
- International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2018. Virus taxonomy: 2018b release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed 19 July 2019).
- International Committee on the Taxonomy of Viruses, 2011. ICTV 9th report. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/201/rhabdoviridae (accessed 18 July 2019).
- Macedo, C.I., Carnieli Jr, P., Brandão, P.E., Rosa, E.S.T., Oliveira, R.N., Castilho, J.G., Medeiros, R., Machado, R.R., Oliveira, R.C., Carrieri, M.L., Kotait, I., 2006. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz. J. Infect. Dis.* 10(5), 341-345. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702006000500008>.

- Madhusudana, S.N., Subha, S., Thankappan, U., Ashwin, Y.B., 2012. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Viol. Sin.* 27(5), 299-302. <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3265-6>.
- Madhusudana, S.N., Paul, J.P.V., Abhilash, V.K., Suja, M.S., 2004. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. *Int. J. Infect. Dis.* 8, 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.02.006>.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Coordenação de informação e epidemiologia - saúde animal. <http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm> (accessed 03 January 2020).
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Controle da raiva dos herbívoros. Manual Técnico. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/MANUAL_RAIVAHORBIVOROS2009.pdf (accessed 18 December 2019).
- Nadin-Davis, S.A., Sheen, M., Wandeler, A.I., 2009. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *J. Med. Virol.* 81, 1484–1497. <https://doi.org/10.1002/jmv.21547>.
- Naji, E., Fadajan, Z., Afshar, D., Fazeli, M., 2019. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method with SYBR Green real-time RT-PCR and direct fluorescent antibody test for diagnosis of rabies. *Jpn. J. Infect. Dis.* doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.009.
- Nishizono, A., Khawplod, P., Ahmed, K., Goto, K., Shiota, S., Mifune, K., Yasui, T., Takayama, K., Kobayashi, Y., Mannen, K., Tepsumethanon, V., Mitmoonpitak, C., Inoue, S., Morimoto, K., 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol. Immunol.* 52, 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00031.x>.
- Perrin, P., Gontier, C, Lecocq, E., Bourhy, H., 1992. A modified rapid enzyme immunoassay for the detection of rabies and rabies-related viruses: RREID-lyssa. *Biologicals* 20, 51-58. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(05\)80007-7](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(05)80007-7).
- Rahmadane, I., Certoma, A.F., Peck, G.R., Fitria, Y., Payne, J., Colling, A., Shiell, B.J., Beddome, G., Wilson, S., Yu, M., Morrissy, C., Michalski, W.P., Bingham, J., Gardner, I.A., Allen, J.D., 2017. Development and validation of an immunoperoxidase antigen detection test for improved diagnosis of rabies in Indonesia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(11), e0006079. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006079>.

- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., Cartuyvels, R., 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J. Clin. Lab. Anal.* 23, 145-151. <https://doi.org/10.1002/jcla.20307>.
- Realegeno, S., Niezgoda, M., Yager, P.A., Kumar, A., Hoque, L., Orciari, L., Sambhara, S., Olson, V.A., Satheshkumar, P.S., 2018. An ELISA-based method for detection of rabies virus nucleoprotein-specific antibodies in human antemortem samples. *PLoS ONE* 13(11), e0207009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207009>.
- Sacramento, D., Bourhy, H., Tordo, N., 1991. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. Probes* 5(3), 229-240. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90045-1).
- Soares, R. M., Bernardi, F., Sakamoto, S.M., Heinemann, M.B., Cortez, A., Alves, L.M., Meyer, A.D., Ito, F.H., Richtzenhain, L.J., 2002. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(1), 109-111. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000100019>.
- Sugiyama, M., Yoshiki, R., Tatsuno, Y., Hiraga, S., Itoh, O., Gamoh, K., Minamoto, N., 1997. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4(6), 727-730.
- Thornton, B., Basu, C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 39(2), 145-154. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.
- Wacharapluesadee, S., Sutipanya, J., Damrongwatanapokin, S., Phumesin, P., Chamnanpood, P., Leowijuk, C., Hemachudha, T., 2008. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J. Virol. Methods.* 151(2), 317-20. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.004>.
- Wadhwa, A., Wilkins, K., Gao, J., Condori Condori, R.E., Gigante, C.M., Zhao, H., Ma, X., Ellison, J.A., Greenberg, L., Velasco-Villa, A., Orciari, L., Li, Y., 2017. A Pan-Lyssavirus TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of highly variable rabies virus and other Lyssaviruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(1), e0005258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005258>.
- World Organisation for Animal Health, 2019a. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2019. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/> (accessed 18 October 2019).
- World Organisation for Animal Health, 2019b. Rabies portal. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/> (accessed 18 October 2019).

World Organisation for Animal Health, 2019c. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2019. <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (accessed 18 December 2019).

World Health Organization, 2005. WHO expert consultation on rabies: first report. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43262> (accessed 19 July 2019).

Table 1

Inter- and intra-run variation in 15 tenfold dilutions of RABV synthetic DNA

Samples		Results (Cq)			
Log ₁₀ dilution	Mean	Inter-run SD	Intra-run SD	Total SD	Total CV %
0	4.48	0.46	0.05	0.37	8.35
-1	7.02	0.39	0.04	0.36	5.11
-2	10.53	0.46	0.05	0.42	4.03
-3	14.06	0.41	0.07	0.38	2.68
-4	17.66	0.42	0.05	0.39	2.18
-5	21.29	0.42	0.04	0.39	1.82
-6	25.01	0.52	0.08	0.48	1.92
-7	28.40	0.37	0.22	0.41	1.46
-8	31.90	0.34	0.53	0.63	1.97
-9	34.32	1.42	0.63	1.42	4.14
-10	34.46	1.31	0.52	1.15	3.34
-11	33.71	1.93	1.30	2.34	6.95
-12	34.65	1.17	0.44	1.23	3.55
-13	32.31	2.71	0.69	2.73	8.46
-14	33.43	1.75	0.36	1.28	3.82

The line between the -8 and -9 log₁₀ dilution represents the limit of detection.

Table 2

Data table for bovine brain samples of known infection status included in the analysis of sensitivity and specificity of the RABV RT-qPCR (PCR) and fluorescent antibody test (FAT) assays for detection of RABV in bovine brains

Test results	FAT+	FAT-	Total
PCR+	10	0	10
PCR-	0	11	11
Total	10	11	21

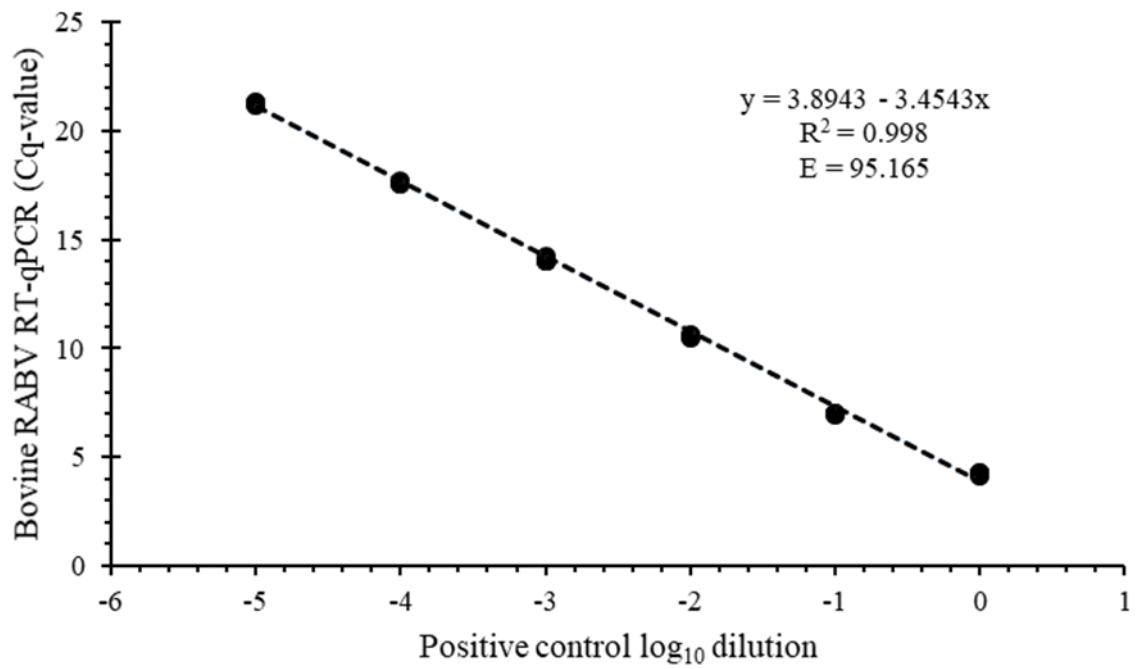


Fig. 1. Scatter plot with the regression line (solid line) of a 10-fold (v:v) dilution series of a bovine RABV synthetic prepared with a nucleic acid load covering the linear range. Each dilution was tested 6 times in a single run.

		Number of reference samples			
		Known positive (10)		Known negative (11)	
Bovine RABV RT-qPCR results	Positive	10	TP	FP	0
	Negative	0	FN	TN	11
		Diagnostic sensitivity TP/(TP + FN) 100% (72.2 a 100%)*		Diagnostic specificity TN/(TN + FP) 100% (74.1 a 100%)*	

Fig. 2. Diagnostic sensitivity and specificity estimates calculated from set of results for samples bovine brain samples of known infection status to rabies virus. TP and FP = True Positive and False Positive, respectively. TN and FN = True Negative and False Negative, respectively. *95% exact binomial confidence limits for diagnostic sensitivity and diagnostic specificity calculated values.

5 DISCUSSÃO

O artigo 1 descreve a análise filogenética de 145 amostras de RABV recuperadas de herbívoros no RS de 2012 a 2017, um número expressivo de amostras originadas de todas as mesorregiões do estado, diferentemente de estudos prévios que analisaram um número limitado de vírus de surtos localizados e/ou de áreas restritas. Este estudo foi baseado na análise da sequência parcial do gene da proteína N, onde foi observada uma alta identidade de nucleotídeos e alta similaridade de aminoácidos entre as sequências de diferentes amostras de vírus analisadas. As sequências também apresentaram alta identidade e similaridade com sequências de RABV de bovinos e de morcegos hematófagos depositadas no GenBank, confirmando a alta conservação da sequência do gene da proteína N entre amostras de RABV. As mutações observadas não envolveram resíduos de aminoácidos associados com a virulência do vírus e, aparentemente, não comprometem a eficácia dos testes laboratoriais de diagnóstico.

A análise filogenética permitiu a segregação dos vírus em dois *clusters* distintos. O *cluster 1* agrupou sequências de RABV cobrindo todo o período estudado, enquanto o *cluster 2* agrupou um número menor de vírus detectados em 2013 a 2017. Em 30 casos, vírus obtidos de uma mesma região em um curto período de tempo agruparam em *clusters* ou *sub-clusters* diferentes, indicando a co-circulação de linhagens diferentes do vírus nesses surtos. A separação em *sub-clusters* diferentes também foi observada em sequências virais obtidas de uma mesma região em momentos diferentes, indicando o envolvimento de vírus diferentes. A co-circulação de duas linhagens de RABV no RS já havia sido relatada por Fernandes (2016) e Cargnelutti et al. (2017) ao testarem um número menor de amostras, indicando que provavelmente tais linhagens já se estabeleceram no ecossistema do RS. A maioria das sequências analisadas no estudo presente agruparam no *cluster 1*, que apresentou uma ampla distribuição geográfica. Já os vírus pertencentes ao *cluster 2* mostraram uma dispersão geográfica mais restrita. Estas linhagens podem ter sido originadas de colônias de morcegos distintas ou podem ter sido mantidas ao longo do tempo em uma mesma colônia. Estes achados reforçam que o desenvolvimento de estratégias eficientes para o controle da raiva herbívora depende do melhor entendimento da dinâmica de transmissão do RABV dentro da colônia de morcegos e entre colônias distintas.

O artigo 2 descreve o desenvolvimento e validação de uma RT-qPCR para o diagnóstico da raiva em bovinos. Os *primers* foram desenhados visando uma região altamente conservada do gene da proteína N de amostras de RABV obtidas de bovinos no RS, pois, apesar de terem sido desenvolvidos vários testes de diagnóstico baseados na detecção de ácidos nucléicos do

RABV (ARAVINDH BABU et al., 2012; ARAVINDHBABU, MANOHARAN, RAMADASS, 2014; BLACK et al., 2002; DEDKOV et al., 2018; FAYE et al., 2017; HOFFMANN et al., 2010; MACEDO et al., 2006; NADIN-DAVIS, SHEEN, WANDELER, 2009; NAJI et al., 2020; SACRAMENTO, BOURHY, TORDO, 1991; SOARES et al., 2002; WACHARAPLUESADEE et al., 2008; WADHWA et al. 2017), nenhum foi validado para a detecção de RABV em amostras de tecido nervoso de bovino.

Este ensaio incorporou um controle positivo sintético próprio e apresentou variação linear, eficiência ($>0,99$) e limite de detecção (12,99 cópias de DNA) similares aos reportados previamente para outras RT-qPCRs para RABV (DEDKOV et al., 2018; FAYE et al., 2017; HOFFMANN et al., 2010; NADIN-DAVIS, SHEEN, WANDELER et al., 2009; WACHARAPLUESADEE et al., 2008; WADHWA et al. 2017). A repetibilidade intra e entre corridas foi adequada ($CV < 9\%$) em todas as diluições e foi similar ao relatado por Faye et al. (2017).

O sistema de extração de RNA e o protocolo de síntese de cDNA utilizados resultaram em um processamento eficiente da amostra de acordo com sistemas manuais usados previamente (NAJI et al., 2020; WADHWA et al., 2017) e não aumentaram as oportunidades de contaminação. O ensaio foi também altamente específico, detectando apenas RABV e não outros patógenos que causam síndromes neurológicas similares a raiva em bovinos no RS.

A DSe e a DS_p foram ambas 100%, usando 21 amostras de cérebro de bovinos de *status* de infecção conhecido, considerando uma estimativa de DSe e de DS_p de 98%, com uma margem de erro de 5% nesta estimativa e um nível de confiança de 90%, de acordo com o padrão de validação da OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c). Estes resultados são similares aos observados no FAT, que é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de RABV. Considerando que seu custo de execução e manutenção é alto quando comparado ao FAT, conclui-se que a RT-qPCR desenvolvida pode ser usada como instrumento/ferramenta complementar para a confirmação do diagnóstico da raiva bovina, esclarecendo os casos inconclusivos de maneira mais rápida do que as outras técnicas disponíveis (isolamento viral em cultivo celular e inoculação em camundongos). Além disso, tendo em vista a alta conservação do gene *N*, este ensaio apresenta potencial capacidade de detecção do RABV em outros espécimes amostrais, dependendo apenas de serem avaliados os critérios analíticos e diagnósticos conforme recomendado pela OIE nas amostras de interesse.

Esta tese, em resumo, traz contribuições sobre o perfil genético dos RABV circulantes em herbívoros no RS. Estas informações poderão ser utilizadas em estudos posteriores que visem a melhor compreensão da dinâmica de transmissão do vírus, colaborando para a adoção

de medidas profiláticas cada vez mais eficazes. Além disso, a detecção da doença em bovinos conta a partir de agora com uma opção de diagnóstico que pode trazer celeridade aos procedimentos de diagnóstico e prevenção da raiva.

6 CONCLUSÃO

Os estudos apresentados nesta tese permitem concluir que:

As análises filogenéticas de baseadas na sequência de nucleotídeos de parte do gene codificante da proteína N, em 145 amostras de RABV recuperadas do encéfalo de herbívoros no período de 2012 a 2017, no Estado do Rio Grande do Sul, evidenciaram a co-circulação de duas linhagens (*clusters* 1 e 2) e sub-linhagens (*sub-clusters* 1a a 1h e 2a a 2d) do vírus na região.

O teste de RT-qPCR desenvolvido e validado para o diagnóstico da raiva em bovinos apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo vir a ser útil como instrumento complementar de diagnóstico de raiva bovina.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. D. F. et al. Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo do sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 356-363, 2011.
- AHMED, K. et al. Evaluation of a monoclonal antibody–based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 736–740, 2012.
- ARAI, Y. T. et al. Nucleoprotein gene analysis of fixed and street rabies virus variants using RT-PCR. **Archives of Virology**, v. 142, n. 9, p. 1787-1796, 1997.
- ARAVINDHBABU, R. P. et al. Evaluation of RT-PCR assay for routine laboratory diagnosis of rabies in post mortem brain samples from different species of animals. **Indian Journal of Virology**, v. 23, n. 3, p. 392–396, 2012.
- ARAVINDHBABU, R. P.; MANOHARAN, S.; RAMADASS, P. Diagnostic evaluation of RT-PCR–ELISA for the detection of rabies virus. **VirusDisease**, v. 25, n. 1, p. 120–124, 2014.
- BADRANE, H. et al. Evidence of two *Lyssavirus* phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268-3276, 2001.
- BANERJEE, A. K. Transcription and replication of rhabdoviruses. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 1, p. 66-87, 1987.
- BANYARD, A. C. et al. Bats and lyssaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 79, p. 239-289, 2011.
- BATISTA, H. B. C. R., et al. Canine rabies in Rio Grande do Sul caused by an insectivorous bat rabies virus variant. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 371-374, 2009.
- BATISTA, H. B. C. R. **Caracterização antigênica e molecular de isolados e desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra o vírus da raiva**. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.
- BERNARDI, F. et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary Crab eating fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 11, p. 3153-3162, 2005.
- BLACK, E. M. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 25-35, 2002.
- BOULGER, L. R., PORTERFIELD, J. S. Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 5, p. 421-424, 1958.

BOURHY, H., KISSI, B., TORDO, N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. **Virology**, v. 194, p. 70-91, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros: Manual Técnico**. 2. ed. Brasília, DF, 2009. 124 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Coordenação de informação e epidemiologia - saúde animal**. Brasília, 2020a. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>> Acesso em: 28 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de tratamento da raiva humana no Brasil**. Brasília, 2011. 40 p. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_tratamento_raiva_humana.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Brasília, 2020b. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/raiva>>. Acesso em: 30/01/2020.

CAPORALE, G. M. M. et al. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 7-13, 2009.

CARGNELUTTI, J. F. et al. Glycoprotein-G-gene-based molecular and phylogenetic analysis of rabies viruses associated with a large outbreak of bovine rabies in southern Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 12, p. 3697-3704, 2017.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 131, n. 1, p. 33-46, 2008.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Genetic characterization of Rabies virus isolated from cattle between 1997 and 2002 in an epizootic area in the state of São Paulo, Brazil. **Virus Research**, v. 144, n. 1-2, p. 215-224, 2009.

CARNIELI JUNIOR, P. et al. Phylogenetic analysis of partial RNA-polymerase blocks II and III of Rabies virus isolated from the main rabies reservoirs in Brazil. **Virus Genes**, v. 45, p. 76-83, 2012.

CASTILHO, J. G. et al. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 95-99, 2008.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. (Eds.). **Rabies**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 101-150.

COERTSE, J. et al. Improved PCR Methods for Detection of African Rabies and Rabies-Related Lyssaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3949-3955, 2010.

COLONNO, R. J.; BANERJEE, A. K. Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 15, p. 93-101, 1978.

COX, J. H.; DIETZSCHOLD, B.; SCHNEIDER, L. G. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 3, p. 754-9, 1977.

DACHEUX, L. et al. Dual Combined Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Lyssavirus Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, e0004812, 2016.

DAVID, D. et al. Identification of novel canine rabies virus clades in the Middle East and North Africa. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 3, p. 967-980, 2007.

DE MATTOS, C. A.; DE MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, C. E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**, 4. ed; Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 39, p. 1364-1408.

DEDKOV, V. G. et al. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 1, p. 18-25, 2018.

DEUBELBEISS, A. et al. Real-Time RT-PCR for the Detection of Lyssavirus Species. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, 476091, 2014.

DIETZSCHOLD, B. et al. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 80, p. 70-74, 1983

DYER, J. L. et al. Evaluation of an indirect rapid immunohistochemistry test for the differentiation of rabies virus variants. **Journal of Virological Methods**, v. 190, p. 29-33, 2013.

ESTERHUYSEN, J. J.; PREHAUD, C.; THOMSON, G. R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 51, p. 31-42, 1995.

FAVORETTO, S. R. et al. Rabies in Marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062-1065, 2001.

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**, v. 44, n. 2, p. 91-95, 2002.

FAYE, M. et al. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 243, p. 120-130, 2017.

FERNANDES, M. E. S. **Sequenciamento e análise filogenética do gene da nucleoproteína de vírus da raiva isolados de bovinos nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.**

2016. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biosistemas) – Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2016.

FOOKS, A. R. et al. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, e530, 2009.

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

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

HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H.; WIKTOR, T. J. Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture. **Journal of Virology**, v. 1, n. 1, p. 152-170, 1967.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV 9th Report**. Washington, 2011. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/201/rhabdoviridae>. Acesso em: 23 out. 2017.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. Washington, 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em 19 jul. 2019.

INSTITUTO PASTEUR. **Profilaxia da raiva humana**: manual técnico. 2. ed. São Paulo, 2000. 33 p.

ISENI, F. et al. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2909-2919, 1998.

ITO, F. H., MEGID, J. 2016. Raiva. In: MEGID, J., RIBEIRO, M.G., PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. pp. 799-824.

ITO, M. et al. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001a.

ITO, M. et al. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. **Virology**, v. 284, n. 2, p. 214-222, 2001b.

ITO, M. et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, n. 3, p. 317-330, 2003.

ITOU, T. et al. Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than month in Rio Grande do Sul in southern Brazil. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 87, 2016.

- IWASAKI, Y. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G. M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. Boca Ratón: CRC Press, 1991. pp. 121-132.
- JACKSON, A. C. et al. Extraneural organs involvement in human rabies. **Laboratory Investigation**, v. 79, p. 945-951, 1999.
- KANITZ, F. A. et al. Epidemiologia molecular de surto de raiva bovina na região central do Rio Grande do Sul, 2012. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 834-840, 2014.
- KOBAYASHI, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 647-652, 2005.
- KOBAYASHI, Y. et al. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 10, p. 1097-1100, 2006.
- KOBAYASHI, Y. et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 44, p. 1-9, 2008.
- KOTAIT, I. et al. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007.
- LENTZ, T. L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? **Science**, v. 215, n. 4529, p. 182-184, 1982.
- LEPPERT, M. et al. Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. **Cell**, v. 18, n. 3, p. 735-747, 1979.
- MACEDO, C. I. et al. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 341-345, 2006.
- MADHUSUDANA, S. N. et al. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 339-345., 2004.
- MADHUSUDANA, S. N. et al. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. **Virologica Sinica**, v. 27, n. 5, p. 299-302, 2012.
- MAYR, A., GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1972. 437 p.
- MEREDITH, C. D., ROSSOUW, A. P., KOCH, H. V. P. An unusual case of human rabies thought to be of chiropteran origin. **South African Medical Journal**, v. 45, n. 7, p. 767-769, 1971.
- MOCHIZUKI, N. et al. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 – 2009. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 32, 2012.

NADIN-DAVIS, S. A.; SHEEN, M.; WANDELER, A. I. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. **Journal of Medical Virology**, n. 81, p. 1484–1497, 2009.

NAJI, E. et al. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method with SYBR Green real-time RT-PCR and direct fluorescent antibody test for diagnosis of rabies. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 73, n. 1, p. 19-25, 2020.

NISHIZONO, A. et al. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. **Microbiology and Immunology**, v. 52, p. 243–249, 2008.

PAEZ, et al. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 4, p. 795–802, 2003.

PERRIN, P. et al. A modified rapid enzyme immunoassay for the detection of rabies and rabies-related viruses: RREID-lyssa. **Biologicals**, v. 20, p. 51-58, 1992.

QUEIROZ, L. H. et al. Rabies in southeast Brazil: A change in the epidemiological pattern. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 93-105, 2012.

RAHMADANE, I. et al. Development and validation of an immunoperoxidase antigen detection test for improved diagnosis of rabies in Indonesia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, e0006079, 2017.

REALEGENO, S. et al. An ELISA-based method for detection of rabies virus nucleoprotein-specific antibodies in human antemortem samples. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, e0207009, 2018.

REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro**. 1 ed. São Paulo: Editora Roca, 2000. 642 p.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. **Relatório raiva bovina 2011 – jun 2016**. Porto Alegre, 2016. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02110534-see-relatorio-raiva-bovina-v-3.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural. **Sistema de Defesa Agropecuária**. Porto Alegre, 2020a. Versão: SDA 20.01.13.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. **Relatório Raiva 2019 RS**, v. 2, suplemento 1, 2020b. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/202002/06120247-situacao-epidemiologica-2019-editado-1.pdf>>. Acesso em: 20/01/2020.

RODRIGUEZ, L. L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E.F (Org.). **Virologia Veterinária**. 2 ed. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 797-830.

ROMIJN, P. C. et al. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 1, p. 81–86, 2003.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991.

SATO, G. et al. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SCHAEFER, R. et al. Studies on antigenic and genomic properties of brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 161-170, 2005.

SCHNEIDER, L. G. Spread of virus within the central nervous system. In: BAER, G. M. (Ed.). **The Natural History of Rabies**. 2 ed. Boca Ratón: RCR Press, 1991. p. 199-216.

SCHNEIDER, M. C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin América? **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 25, n. 3, p. 260-269, 2009.

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

SEIF, I. et al. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 53, p. 926-34, 1985.

SHOPE, R. E. et al. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus. **Journal of Virology**, v. 6, n. 5, p. 690-692, 1970.

SINGH, R. et al. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 37, n. 1, p. 212-251, 2017.

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

SUGIYAMA, M. et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated japanese domestic dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 6, p. 727-730, 1997.

SUIN, V. et al. A Two-Step Lyssavirus Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Degenerate Primers with Superior Sensitivity to the Fluorescent Antigen Test. **BioMed Research International**, v. 2014, 256175, 2014.

SUPERTI, F. et al. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to CER cells. Brief Report. **Archives of Virology**, v. 81, n. 3-4, p. 321-328, 1984.

TESTA, D.; CHANDA, P. K.; BANERJEE, A. K. Unique mode of transcription in vitro by vesicular stomatitis virus. **Cell**, v. 21, n. 1, p. 267-275, 1980.

THOULOZE, M. I. et al. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7181-7190, 1998.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESTIN, F. X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. Genebra, 1996. p. 28-51.

TSIANG, H. Pathophysiology of rabies virus infection of nervous system. **Advances in Virus Research**, v. 42, p. 375-412, 1993.

TUFFEREAU, C. et al. Low-affinity nerve growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. **EMBO Journal**, v. 17, n. 24, p. 7250-7259, 1998.

VELASCO-VILLA, A. et al. Molecular diversity of rabies viruses associated with bats in Mexico and other countries of the Americas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1697-1710, 2006.

WACHARAPLUESADEE, S. et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 2, p. 317-20, 2008.

WACHARAPLUESADEE, S. et al. Detection of rabies viral RNA by TaqMan real-time RT-PCR using non-neural specimens from dogs infected with rabies virus. **Journal of Virological Methods**, v. 184, n. 1-2, p. 109-112, 2012.

WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of highly variable rabies virus and other Lyssaviruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, e0005258, 2017.

WAKELEY, P. R. et al. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2786-2792, 2005.

WIKTOR, T. K., FLAMAND, A., KOPROWSKI, H. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 1, p. 33-46, 1980.

WIKTOR, T. K., KOPROWSKI, H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: Detection of antigenic variants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 75, n. 8, p. 3938-3942, 1978.

WITT, A. A., HOFFMEISTER, W. O desafio do controle da população de morcegos hematófagos no Rio Grande do Sul - o papel dos Núcleos de Controle da Raiva. **Informativo Técnico**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201905/07102842-it-desafio-no-controle-de-morcegos-hematofagos-no-rs.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert committee on rabies**: seventh report (technical report series 790). Genebra, 1984. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38724/1/WHO_TRS_709.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO expert consultation on rabies: first report.** Genebra: WHO Press, 2005. 121 p. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43262>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Consultation on Rabies: Second Report** (WHO Technical Report Series; no. 982). Genebra, 2013. 139 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85346/1/9789240690943_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 ago. 2017.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2019.** Paris, 2019a. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Rabies portal.** Paris: 2019b. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** Paris, 2019c. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Eds.). **Rabies.** 2. ed. San Diego: Academic Press, 2007. cap. 2, p. 23-68.

WUNNER, W. H.; REAGAN, K. J.; KOPROWSKI, H. Characterization of saturable of binding sites for rabies virus. **Journal of Virology**, v.50, n. 3, p. 691-697, 1984.