

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO**

Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RAIVA EM ÁREAS DE FOCO
NO ESTADO DO MARANHÃO**

**São Luís – MA
2023**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

TESE

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RAIVA EM ÁREAS DE FOCO
NO ESTADO DO MARANHÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Estadual do Maranhão para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração:

Medicina Veterinária Preventiva, Reprodução
e Conservação Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Borges Costa

Doutorando:

Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita

São Luís – MA

2023

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

Mesquita, Eric Takashi Kamakura de Carvalho.

Aspectos epidemiológicos da raiva em áreas de foco no Estado do Maranhão. / Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita – São Luís, 2023.

63f.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Doutorado.) - Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Borges Costa

1. Lyssavirus. 2. Morcegos. 3. Canídeos. I. Título.

CDU: 616.89-008.444.9(812.1)

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MESQUITA, Eric Takashi Kamakura de Carvalho

Título: Aspectos epidemiológicos da raiva em áreas de foco no estado do maranhão

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias do
Curso de Medicina Veterinária da Universidade de
Estadual do Maranhão para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Não importa o quão poderoso você se
torne, nunca tente fazer tudo sozinho.
Caso contrário irá falhar.
(Itachi Uchiha)

Aos meus pais Alcir de Carvalho Mesquita (*in memoriam*) e Laura Kamakura de Carvalho Mesquita pelos ensinamentos de vida que forjaram meu caráter.

À minha esposa Fabiola Ewerton pelo amor e companheirismo e ao meu filho Yuri Takeo pelos momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por Sua infinita graça e por me conceder o dom da vida.

À minha família que sempre será meu porto seguro.

Ao amigo de longas datas e muitas jornadas Francisco Borges Costa por aceitar o desafio de ser meu orientador.

Ao Amigo Lídio Gonçalves pelos grandes ensinamentos pelo mundo da biologia molecular.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular Hivylla Lorrana, Fernando Ramos, Paulo Ricardo, Carlos Eduardo Gamero, Fabiano Silva, Felipe Lobato, Iago Mendonça, pela jornada no laboratório de biologia molecular na pandemia, que apesar de muito dura o companheirismo de vocês deixava o trabalho mais leve, e enriquecia o aprendizado.

Ao amigo e ex-diretor do IOC/LACEN-MA Luiz Fernando Ramos por acreditar no nosso projeto de doutorado e pelo suporte ao laboratório de virologia para raiva.

Aos Profs. Drs. Paulo Brandão e Enio Mori pela ajuda e dicas na pesquisa do doutorado.

À UEMA pela oportunidade de participar de um curso de Doutorado.

À CAPES pela oportunidade de participar de um curso de Doutorado.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na execução desta pesquisa, os meus sinceros agradecimentos.



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA CIENTÍFICA

Protocolo Nº **16/2022**

Data de entrega **06/04/2022**


Recebido por e-mail
Data: 06/04/2022

Título do Projeto: **Ocorrência e caracterização molecular do vírus da
raiva no Estado do Maranhão**

Responsável: **Dr. Francisco Borges Costa**

Instituição: **Universidade Estadual do Maranhão - UEMA**

Centro: **Ciências Agrárias – CCA**

Departamento: **Patologia**

Laboratório: **Parasitologia - LAMP**

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

Uso do CEEA

Protocolo Nº **16/2022**

Uso do CEEA

Data de entrega **06/04/2022**

Título do Projeto: **Ocorrência e caracterização molecular do vírus da
raiva no Estado do Maranhão**

Responsável: **Dr. Francisco Borges Costa**

Instituição: **Universidade Estadual do Maranhão – UEMA**

Centro: **Ciências Agrárias – CCA**

MESQUITA, E. T. K. de C. **Aspectos epidemiológicos da raiva em áreas de foco no Estado do Maranhão**. 2023. 62p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Centro de Ciências Agrárias – Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Estadual do Maranhão, Maranhão, 2023.

RESUMO - A raiva é uma doença viral aguda que afeta os mamíferos, causada por um RNA vírus pertencente à família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. A doença é transmitida através da mordida ou arranhão de um animal infectado. A raiva foi uma das primeiras doenças infecciosas estudadas de forma científica, com a descrição detalhada dos sintomas e do curso clínico feita por estudiosos gregos e romanos nos primeiros séculos d.C. A casuística mundial da raiva é variável em diferentes regiões do mundo. Estima-se que a doença cause cerca de 60.000 mortes por ano em todo o mundo, sendo mais comum em áreas com falta de medidas de controle efetivas. A maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento, onde a vacinação de animais e a profilaxia adequada após exposição são menos acessíveis. O vírus da raiva possui algumas variantes que são específicas de cada reservatório, sendo que no Brasil já foram identificadas cinco destas variantes. Este estudo tem como objetivo conhecer melhor os aspectos epidemiológicos das variantes dos vírus rábicos que circulam no Estado do Maranhão através de análises imunológicas e moleculares, bem como seus reservatórios, e distribuição nos biomas. Para tanto, utilizou-se 62 amostras de material biológico enviados para os laboratórios de referência no Estado no período de 2015 a 2022 por técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e reação em cadeia pela polimerase (PCR). Foram utilizados os primers 504 (senso) e 304 (reverse) para o gene N nas reações de PCR que amplificam 240pb, e as amostras positivas foram encaminhadas para o sequenciamento genético com o objetivo de identificar a variante antigênica. De todas as amostras, 74% foram positivas na IFD e 63% foram positivas na PCR. Entre as amostras negativas na IFD, 19% foram detectáveis para o vírus da raiva na PCR. De todas as amostras positivas nos dois testes, somente 28% tiveram sucesso no sequenciamento, onde foi identificado variantes antigênicas de *Desmodus rotundus* e *Cerdocyon thous*. Observou-se que essas variantes circulam em ambos os biomas da Amazônia e Cerrado, porém a variante de morcegos teve maior ocorrência no bioma amazônico, enquanto a variante de canídeo silvestre foi mais prevalente no cerrado. Desta forma, a variante de canídeo silvestre desperta um alerta para a vigilância epidemiológica, pois já aparece sendo transmitida para cão doméstico e humano no Estado do Maranhão.

Palavras-chave: Lyssavirus, Morcegos, Canídeos

MESQUITA, E. T. K. de C. **Epidemiological aspects of rabies in focus areas in the State of Maranhão**. 2023. 62p. Thesis (Ph.D. in Animal Science) – Postgraduate Program in Animal Science – Center for Agricultural Sciences – Veterinary Medicine Course, State University of Maranhão, Maranhão, 2023.

ABSTRACT – Rabies is an acute viral disease that affects mammals, caused by an RNA virus belonging to the family *Rhabdoviridae* and the genus *Lyssavirus*. The disease is transmitted through the bite or scratch of an infected animal. Rabies was one of the first infectious diseases to be scientifically studied, with a detailed description of symptoms and clinical course provided by Greek and Roman scholars in the early centuries AD. The global incidence of rabies varies in different regions of the world. It is estimated that the disease causes about 60,000 deaths worldwide each year, with higher prevalence in areas lacking effective control measures. Most cases occur in developing countries where animal vaccination and proper post-exposure prophylaxis are less accessible. The rabies virus has several variants that are specific to each reservoir, and in Brazil, five of these variants have been identified. This study aims to better understand the epidemiological aspects of rabies virus variants circulating in the state of Maranhão through immunological and molecular analyses, as well as their reservoirs and distribution in biomes. To achieve this, 62 biological samples sent to reference laboratories in the state between 2015 and 2022 were analyzed using fluorescent antibody test (FAT) and polymerase chain reaction (PCR) techniques. The primers 504 (sense) and 304 (reverse) were used for the N gene in PCR reactions, amplifying 240 bp, and positive samples were subjected to genetic sequencing to identify the antigenic variant. Of all the samples, 74% tested positive in DIF and 63% tested positive in PCR. Among the samples negative in DIF, 19% were detectable for the rabies virus in PCR. Of all the samples that tested positive in both tests, only 28% were successfully sequenced, revealing antigenic variants of *Desmodus rotundus* and *Cerdocyon thous*. It was observed that these variants circulate in both the Amazon and Cerrado biomes, with the bat variant being more prevalent in the Amazon biome, while the wild canid variant was more prevalent in the Cerrado. Therefore, the wild canid variant raises an alert for epidemiological surveillance, as it is already being transmitted to domestic dogs and humans in the state of Maranhão.

Keywords: Lyssavirus, bats, canid

Lista de abreviaturas

a.C. – antes de Cristo

AGED-MA – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

AgV – Variante Antigênica

cDNA – DNA complementar

CVS - *Challenge Virus Standart*

d.C – depois de Cristo

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Trifosfato ou Nucleotídeos do DNA

Et al – e outros(as)

FAPEMA – Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão

FAT – Fluorescent Antibody Test

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFD – Imunoflorescência Direta

IOC/LACEN-MA – Instituto Osvaldo Cruz/Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão

RNA – Ácido Ribonucléico

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan Americana da Saúde

PAHO – Pan American Health Organization

PBS – Solução Salina Tamponada

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RABV – *Rabies lyssavirus*

RNase – enzima degradante de RNA

RT-PCR – PCR com Transcrição Reversa

WHO – World Health Organization

Lista de Tabelas

Capítulo 2 – Epidemiological aspects of rabies in focus areas in the State of Maranhão.

Table 01	Data from biological samples of animals suspected of rabies between the years 2015 to 2022 in the State of Maranhão, Brazil.....	41
Table 02	Thermal cycler programming for PCR: number of cycles, temperature, and time conditions.	42
Table 03	Results of fluorescence antibody test (FAT) and reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) in samples of the central nervous system (CNS) from suspected animals with rabies from 2015 to 2022 in the state of Maranhão, northeastern Brazil.	44
Table 04	Results of central nervous system (CNS) samples from suspected animals with rabies, viable for phylogenetic sequencing, were analyzed according to reservoir species, virus variant, and biomes from 2015 to 2022 in the state of Maranhão, northeastern Brazil.	45

Capítulo 3 – Investigation of Wild Canid-Mediated Human Rabies Death, Brazil, 2021

Table 1	Changes in serum and cerebrospinal fluid (CSF) rabies virus neutralizing antibodies titers by Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT IU/mL).	63
----------------	---	----

Lista de Figuras

Capítulo 2 – Epidemiological aspects of rabies in focus areas in the State of Maranhão.

- Figure 01** Phylogenetic tree based on the sequencing viable samples of the Rabies virus N gene. Distance method was used, with Neighbor-Joining Algorithm, MCL substitution model, and 1000 bootstrap repetitions with MEGA Software 11.0.11.45
- Figure 02** Geographic distribution of rabies virus variants in the State of Maranhão, Brazil. Each color on the map represents a specific biome: green for Amazon, wheat for Cerrado, and gray for Caatinga (highlighted in red). The names of the cities are indicated in black.....46

Capítulo 3 – Investigation of Wild Canid-Mediated Human Rabies Death, Brazil, 2021

- Figure 1** Backyard of the child's house, kitchen: aggression-probable local of the fox, and its remains near the house.....62
- Figure 2** Timeline from surveillance to the outcome of the case.63

Lista de Símbolos

% - por cento

Nm – nanômetros

°C – grau Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

mg – Miligrama

μl – Microlitros

mm – Milímetros

pb – Pares de Base

μM – Micromolar

U – Unidades

SUMÁRIO

Capítulo 1- Considerações Gerais	16
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
Histórico da Raiva	18
Etiologia	20
Patogenia	23
Transmissibilidade	25
Sinais Clínicos	25
Profilaxia	27
Diagnóstico	28
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 – Epidemiological aspects of rabies in focus areas in the State of Maranhão.	37
Original article	38
ABSTRACT	38
INTRODUCTION	38
MATERIALS AND METHODS	40
Collection of biological material	40
Fluorescent Antibody Test (FAT)	40
Sequencing analysis of the viable samples of the N gene of RABV	43
Phylogenetic Analysis	44
RESULTS	44
Reported rabies samples in animals	44
Phylogenetic Sequencing	45
DISCUSSION	48
Conclusion	50
Author Contributions	50
Conflict of Interest	51
Ethics Statement	51
REFERENCES	51
Capítulo 3 – Investigation of Wild Canid-Mediated Human Rabies Death, Brazil, 2021	55

Dispatch56

Abstract.....56

Text.....57

The Study58

Conclusions.....60

References61

Capítulo 1- Considerações Gerais

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença que acompanha a humanidade há milhares de anos, aparecendo em contos folclóricos e mitológicos de alguns povos (STEELE, 1991; BATISTA et al, 2007). Por se tratar de uma zoonose cosmopolita com prognóstico muito reservado (praticamente 100% de letalidade após manifestarem os sintomas clínicos da doença), esta enfermidade possui um grande interesse mundial na comunidade científica, portanto há muitas pesquisas acerca dessa temática por ser uma doença evitável, porém ainda morrem aproximadamente 59.000 pessoas por ano infectados pela raiva, sendo que a maioria desses casos são pessoas jovens (abaixo de 15 anos), que vivem na zona rural e em países em desenvolvimento da Ásia e África (FISCHER et al, 2020; WHO, 2019; WADHWA et al, 2017).

Por ser uma doença que acomete os mamíferos, há uma biodiversidade de espécies atuando na cadeia de transmissão da raiva nos seus quatro ciclos conhecidos: aéreo, silvestre, rural e urbano com participação de animais domésticos e silvestres (ROCHA et al, 2015). Por conta dessa rede epidemiológica complexa, e por fazer parte das doenças classificadas como síndromes nervosas, o controle epidemiológico da raiva torna-se difícil em algumas áreas, pois um mesmo animal pode fazer parte de vários ciclos, além de ser confundida com outras enfermidades de suspeita clínica nervosa, bem como intoxicações (BRASIL, 2021; MORI, 2020).

No Brasil a transmissão da raiva ocorre principalmente por agressões de animais silvestres (direta ou indiretamente), onde podemos citar como principais reservatórios os morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* (mas também morcegos não-hematófagos como *Artibeus lituratus*), o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (MORI, 2020; ROCHA et al, 2015).

O conhecimento do tipo viral de um animal infectado se torna fundamental para as ações de bloqueio da transmissão viral otimizando as atividades e recursos do controle da raiva. Desta forma, o diagnóstico sorológico, biológico e molecular com a identificação do tipo viral, eficaz e rápido se torna uma ferramenta

fundamental para o controle (BRASIL, 2021; ESCOBAR et al, 2015; INSTITUTO PASTEUR, 2009).

O Maranhão é considerado endêmico para a raiva desde a primeira década do Século XXI quando aconteceu um foco epidêmico com 24 casos humanos devido a transmissão de raiva por morcegos hematófagos (WADA et al, 2011), sendo assim o maior caso de óbitos em humanos por raiva no continente americano ou para o melhor do nosso conhecimento, para o mundo. Por isso, é de fundamental importância conhecer as variantes que ocorrem no Maranhão, a eco epidemiologia da raiva, bem como um diagnóstico preciso e rápido onde se observam ainda casos de raiva humana. Para isto, este trabalho objetivou conhecer melhor os aspectos epidemiológicos das variantes dos vírus rábicos que circulam no ambiente, determinando a ocorrência do vírus rábico (suas variantes) em animais domésticos e silvestres através de análises moleculares, assim como o papel dos hospedeiros reservatórios, além de descrever um caso de raiva humana no Estado do Maranhão.

REVISÃO DE LITERATURA

Histórico da Raiva

A raiva é uma doença que possui relatos antes do *anno Domini*, ou seja, antes de Cristo. Na Mesopotâmia já se temia os riscos que uma mordida de um cachorro poderia acarretar ao homem, assim como existia um “tratamento” que envolvia rituais e uso de poções encantadas (FOOKS & JACKSON, 2020). Comparavam-se as mordidas de cães raivosos análogas aos venenos de cobras e escorpiões, sendo também considerada como uma forma de castigo divino (isto é, ira divina) sendo este considerado um dos poderes destrutivos dos deuses. Cabia aos feiticeiros da época (harúspices e astrólogos) o ofício de prever quando poderiam ocorrer surtos da doença (FOOKS & JACKSON, 2020; YUHONG, 2001; STEELE, 1991).

Na antiga Babilônia existia uma “lista padrão de doenças babilônicas”, onde era descrita a “doença do Medo” e uma doença chamada *pu-ul-hi-tu* que segundo

as narrações indicam ser como a hidrofobia, um dos sintomas da raiva. As tábuas cuneiformes com o código de Eshnunna, escavadas no Iraque, que data cerca de 1.930 a.C. (que serviram de base para o Código de Hamurabi) cita uma penalidade por ataque de cão raivoso (na lei não indica o termo cão raivoso e sim cão atroz ou cruel), no qual alude que se a autoridade do local identificasse o animal e comunicasse ao dono deste cão e este não fizesse nada, e se o cão mordesse um homem que viesse a óbito por conta da mordida, o dono deveria pagar 40 siclos de prata; e se esse cão mordesse um escravo e este morresse, o dono deveria pagar 15 ciclos de prata aos cofres públicos (MORI, 2020; TARANTOLA, 2017; YUHONG, 2001; ROTH et al., 1997).

Outras civilizações antigas como a Grécia também fizeram relatos sobre a raiva, como exemplo no poema *Ilíada*, Homero reporta-se a raiva quando cita que Sírius (estrela mais brilhante do céu, pertencente à Constelação de Cão Maior do Cinturão de Orion) exercia um poder maligno sobre a saúde mental das pessoas e essa influência foi associada aos cães raivosos por todo o Mediterrâneo Oriental e Egito (STEELE, 1991). O livro sagrado da Pérsia, o Avestá (200 a 400 a.C.), relata orientações para a prevenção da raiva evitando ser mordido por cães suspeitos (TARANTOLA, 2017).

No ano 60 d.C., Lucius Junius Moderatus Columella, escritor romano que possuía uma grande experiência com a exploração agrícola escreve um tratado conhecido por “*De Re Rustica*”, um importante tratado sobre agropecuária onde também orientava a prática de cortar a cauda dos filhotes de cães no seu 40º dia de vida como forma de prevenir a raiva nesses animais para que no futuro esses animais não transmitissem aos seus donos sendo considerado por alguns autores como o primeiro relato de *One Health* da história (TARANTOLA, 2017; CARDIFF et al, 2008).

Nessas civilizações os estudiosos se baseavam na observação dos acontecimentos com levantamento de suas hipóteses por meio de suas observações e também influenciados por crenças e misticismos religiosos ligados à época e assim postulavam todo tipo de tratamento para curar a raiva (FOOKS & JACKSON, 2020; BLANCOU, 1994; STEELE, 1991).

Inicialmente, acreditava-se que os cães possuíam veneno igual as cobras e portanto “envenenavam” as pessoas com sua saliva, em vista disso foram adotados métodos para “tratar” a raiva do mesmo jeito usado para acidente com cobras como a sucção da mordida para retirada do veneno, sangrias, cauterização do local da mordida por meios químicos (substâncias cáusticas) ou por meios físicos (ferro incandescentes), além da retirada do tecido “envenenado” por meios cirúrgicos, sendo algumas dessas práticas utilizadas até o final do Século XVIII (FOOKS & JACKSON, 2020; STEELE, 1991). Ge Hong (300 d.C.), oficial do sul da Dinastia Jin (263 – 420 d.C.), renomado alquimista chinês orientava a aplicação do cérebro do animal agressor na ferida como meio de se anular o desenvolvimento da raiva (WANG et al, 1999).

Os escritores romanos Gaius Plinius Secundus (conhecido como Plínio, o velho) e Publio Ovidio Naso (conhecido como Ovídio) no século I d.C., apontam a raiva como sendo causada por um verme localizado no frênulo lingual, onde a retirada do mesmo prevenia a transmissão da raiva ou se a pessoa fosse agredida, Plínio indicava que a pessoa utilizasse na ferida omeletes temperadas com raízes de uma flor conhecida como “rosa canina” (TARANTOLA, 2017; STEELE, 1991).

Essas práticas só deixaram de ser utilizadas no final do século XIX quando Louis Pasteur conseguiu provar a verdadeira causa da raiva e subsequentemente inventou a vacina contra raiva. Pesquisadores da época conseguiram isolar o vírus da raiva por meio de inoculação em coelhos, tornando esses vírus muito estáveis por meio de sucessivas passagens pelo sistema nervoso central desses animais (STEELE, 1991) As primeiras doses de vacinas antirrábicas utilizadas por Pasteur foram utilizadas em 1885, em um menino de 9 anos chamado Joseph Meister, que havia sido mordido 14 vezes por um cão raivoso na Alsácia e a segunda no jovem francês Jean-Baptiste Berger Jupille após um combate contra um cão raivoso, em ambos os casos Pasteur conseguiu salvar suas vidas (TARANTOLA, 2017; RUPPRECHT & PLOTKIN, 2013; STEELE, 1991).

Etiologia

A raiva é causada por um RNA vírus neurotrópico do filo Negarnaviricota, subfilo Haploviricotina, classe Monjiviricetes da ordem Mononegavirales, família

Rhabdoviridae, do gênero *Lyssavirus* e espécie *Rabies virus* (MORI, 2020; KING et al, 2012; KOTAIT et al, 2009; BATISTA et al, 2007; WUNNER, 2007).

O gênero *Lyssavirus* possui, de acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2022) 18 espécies relatadas (17 reconhecidas e 1 em processo de reconhecimento) que estão agrupados em filogrupos que apresentam características genéticas e imunopatológicas semelhantes a saber:

- a) Filogrupo I – 1) *Rabies lyssavirus* (RABV); 2) *Duvenhage lyssavirus* (DUVV); 3) *European bat 1 lyssavirus* (EBLV-1); 4) *European bat 2 lyssavirus* (EBLV-2); 5) *Australian bat lyssavirus* (ABLV); 6) *Aravan lyssavirus* (ARAV); 7) *Bokeloh bat lyssavirus* (BBLV); 8) *Gannoruwa bat lyssavirus* (GBLV); 9) *Irkut lyssavirus* (IRKV); 10) *Khujand lyssavirus* (KHUV); 11) *Taiwan bat lyssavirus* (TBLV);
- b) Filogrupo II – 12) *Lagos bat lyssavirus* (LBV); 13) *Mokola lyssavirus* (MOKV); 14) *Shimoni bat lyssavirus* (SHIBV).
- c) Filogrupo III – 15) *West Caucasian bat lyssavirus* (WCBV); 16) *Ikoma lyssavirus* (IKOV) e *Lleida bat lyssavirus* (LLEBV) (ICTV, 2022; HU et al, 2018; CEBALLOS et al, 2013).

O vírus *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV) é a espécie em processo de reconhecimento ao gênero *Lyssavirus*, pois a sequência da região de codificação ainda está incompleta (ICTV, 2022).

A espécie do RABV possui algumas variantes antigênicas e no Brasil já foram identificados cinco destas variantes: i – Agv 1 e Agv 2 – comum em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), típico no ciclo urbano. Acredita-se que essa variante tenha sido erradicado devido a sucessivas campanhas de vacinação antirrábica em cães e gatos (MORI,2020; FAVORETTO et al, 2013); ii – Agv 3 – também conhecida como variante do morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) faz parte do ciclo aéreo, sendo possível também ser isolada de morcegos frugívoros da espécie *Artibeus* sp (MORI, 2020; FAVORETTO et al, 2013); iii – Agv 4 –

conhecida como variante de morcegos insetívoros *Tadarida brasiliensis*, outro integrante do ciclo aéreo (MORI, 2020; FAVORETTO et al, 2013); iv – Agv 6 - conhecida como variante de outra espécie de morcegos insetívoros *Lasiurus cireneus* (MORI, 2020; FAVORETTO et al, 2013).

As variantes antigênicas de animais silvestres do Brasil, apesar de não possuir uma compatibilidade com nenhuma das outras variantes conhecidas, as variantes da espécie canídeos silvestres *Cerdocyon thous*, de morcegos insetívoros da espécie *Histiotus velatus* e de saguis da espécie *Callithrix jacchus* apresentam perfis antigênicos constantes (MORI, 2020).

O vírion (partícula infecciosa completa) da raiva possui uma forma bem peculiar em formato cilíndrico muito parecido como um projétil balístico, possuindo dimensões de 75nm (média) de diâmetro e 100 a 300nm de comprimento (MACLACHLAN & DUBOVI, 2016). Possui um genoma com fita simples de RNA de sentido negativo, não segmentado com aproximadamente 12.000 nucleotídeos (WUNNER & COLZEMANN, 2020). No início (segmento 3') temos a região *Leader* e no final (segmento 5') temos a região *Trailer*, ambas não codificantes. Seu genoma tem formato helicoidal que codificam cinco proteínas estruturais: proteína N (nucleoproteína) – é um sítio antigênico conservado muito importante para a detecção dos lyssavírus (REDDY et al, 2018); proteína P (fosfoproteína) – relacionada com a replicação do genoma viral e é uma área menos conservada; proteína L (larga ou RNA polimerase-dependente de RNA) – responsável pela atividade enzimática da transcrição viral (WUNNER & COLZEMANN, 2020); proteína G (glicoproteína) – são projeções trimétricas que formam as espículas do envelope que são responsáveis pela união e fusão com a membrana plasmática da célula hospedeira, ligada à patogenicidade do vírus e afinidade celular; e proteína M (proteína matriz) – função estrutural que dá forma característica do vírus (WUNNER & COLZEMANN, 2020; LI et al., 2019; DIETZGEN et al., 2017).

O material genético do vírus da raiva representa, aproximadamente, somente 3% da composição química do vírus, sendo que a maior parte é composta por proteínas (67 a 74%), lipídeos (20 a 26%) e carboidratos (3%), sendo que as proteínas N, P e L são localizadas na nucleoproteína que são envoltas pelas

proteínas M e G que formam o capsídeo, dispostas na ordem {3'-N-P-M-G-L-5'} (MORI, 2020; WUNNER & COLZEMANN, 2020).

O vírus da raiva fora do hospedeiro se inativa facilmente e é muito sensível aos solventes lipídicos como clorofórmio, sabão, acetona, éter, ao etanol na concentração de 45 a 70%, as substâncias à base de amônia quaternária e iodo, hipoclorito de sódio a 2%, soda cáustica a 2%, formaldeído a 10%, glutaraldeído a 2%, sabão, fenóis a 5%, cresóis (MORI, 2020; BATISTA et al, 2007).

Além de ser sensível às substâncias químicas, é sensível aos fatores físicos tais como: luz ultravioleta, luz solar, inativação a temperatura de 50°C por 15 minutos ou 60°C por 35 segundos, entretanto, pode se manter estável em um pH entre 5 – 10, sensibilidade ao dessecamento bem como a congelamentos e descongelamentos sucessivos; pode permanecer viável por dias a uma temperatura de 4°C ou por anos se mantidos a uma temperatura de -20°C, -70°C ou liofilizados (4°C) podem ficar preservados e infectantes por um período indeterminado (MORI, 2020; KOTAIT et al, 2009; BRASIL, 2008; BATISTA et al, 2007).

Patogenia

A raiva é uma doença de infecciosa aguda e progressiva, não contagiosa e de curso fatal que possui características neurológicas promovendo uma encefalomielite, causada por um Lyssavirus neurotrópico que acomete todos os mamíferos, sendo os indivíduos da ordem Carnívora e Chiroptera os principais reservatórios e os mamíferos mais relevantes envolvidos nessa cadeia epidemiológica conforme (MORI, 2020; FOOKS & JACKSON, 2020; HANLON, 2013).

O vírus da raiva precisa ser inoculado nos hospedeiros, pois não consegue penetrar a pele íntegra, dessa forma a via mais comum de penetração é por meio de mordeduras ou arranhaduras de animais infectados, ou contato da saliva do animal infectado com uma solução de continuidade da vítima, porém nem sempre

uma mordida de um animal infectado levará ao quadro de raiva (MORI, 2020; FOOKS et al, 2017).

Após inoculação do vírus no hospedeiro, se iniciará uma fase de replicação nas células musculares, epiteliais e sub-epiteliais próximos da mordedura, fase esta chamada de primeira fase ou fase de replicação, onde o vírus se multiplica até alcançar uma quantidade suficiente para alcançar as terminações nervosas mais próximas. O vírus da raiva, através da sua glicoproteína G fará a ligação com a membrana da célula nervosa fazendo assim a penetração através da via endossomal da célula hospedeira, onde posteriormente ocorrerá a migração centrípeta por meio do transporte axonal do Sistema Nervoso Periférico para o Sistema Nervoso Central (GLUSKA et al, 2014), onde expressará sua replicação com mais intensidade infectando múltiplos neurônios, ocasionando uma disseminação transsimpática emigração centrífuga para outros órgãos (como glândulas salivares) iniciando assim o quadro clínico (sintomas clássicos) (FU & JACKSON, 2005).

O período de incubação, ou fase de eclipse, que vai desde a agressão do animal até o surgimento dos primeiros sintomas clínicos é muito relativo e variável. A média considerada para um período de incubação do vírus da raiva, no humano, varia entre 2 a 8 semanas (KOTAIT et al, 2015) com casos de incubação em dias ou até após 12 meses (BATISTA et al, 2007).

Essa variação tem vários fatores naturais que entram como condições determinantes como: cepa viral inoculada, quantidade de vírus inoculados no ato da agressão, condições imunológicas do hospedeiro, proximidade do sistema nervoso central, espécie do reservatório, forma da lesão causada pelo animal (MORI, 2020; WHO, 2018; HEMACHUDHA et al, 2013).

Dependendo da espécie animal o período de incubação pode variar muito como exemplo: i – cães – 4 a 92 dias (FOOKS & JACKSON, 2020); ii – raposas – 4 a 153 dias (BLACK & LAWSON, 1970); iii – gatos – 14 a 43 dias (SOULEBOT et al, 1981); iv – herbívoros – 25 a 90 dias (KOTAIT et al, 2015); v – gambás – 11 a

201 dias (MOORE et al, 2017); vi – quirópteros – indeterminado (INSTITUTO PASTEUR, 2009).

Transmissibilidade

A transmissibilidade da raiva se dá após a migração centrífuga do vírus quando este atinge as glândulas salivares, perdurando até a morte do hospedeiro, sendo nessa fase a transmissão da raiva de um hospedeiro a outro, porém há um período que o animal pode transmitir o vírus da raiva sem estar necessariamente com os sintomas clássico da doença, ou seja, na fase prodrômica que pode durar de dois a cinco dias quando, enfim, manifestam-se os primeiros sintomas (MORI, 2020).

Sinais Clínicos

A raiva apresenta formas variadas de sinais clínicos que se confundem com outras doenças nervosas, tornando muito difícil concluir o diagnóstico somente com os sinais clínicos. Os sintomas diversos são consequência direta de onde ocorreram as lesões causadas pelo vírus no SNC. De uma forma geral a raiva se apresenta de duas formas: i – forma furiosa – associada a vírus transmitidos por canídeos; ii – forma paralítica – associada a vírus transmitidos por morcego (MORI, 2020).

A fase sintomática pode ser dividida em etapas tais como:

i: Fase prodrômica ou fase inicial – considerada a fase inicial dos sintomas (inespecíficos) tais como calafrios, mal-estar, febre, ansiedade, dor de cabeça, insônia, letargia, diarreia, vômito entre outros (BATISTA et al, 2007). Geralmente essa fase passa despercebidas em animais por conta desses sintomas inespecíficos, já no ser humano se torna mais evidente, porém não elucidativo. Essa fase vai se agravando a cada dia (ou até mesmo em horas) tornando mais evidente um quadro neurológico, onde podemos observar no animal um quadro de mudança de comportamento, ou ainda pode-se observar o animal começando a se isolar do rebanho, ou procurar lugares mais escuros e com menos barulho, pois

também nessa fase ocorre um aumento da cefaleia o que é potencializado com estímulos luminosos e sonoros (FOOKS & JACKSON, 2020).

Nessa fase, observa-se o início da agressividade em alguns animais, principalmente cães, gatos e canídeos silvestres, enquanto nos morcegos é comum observá-los voando no período do dia (INSTITUTO PASTEUR, 2009). Há relatos que no homem ocorrem dor, parestesia ou paralisia no local da agressão em até 70% dos casos, bem como o início da sialorreia e a diminuição da deglutição, andar descoordenado, estrabismo e diarreia com ou sem fezes sanguinolentas (KOTAIT et al, 2015);

ii) Fase neurológica aguda ou fase clínica – a forma clássica da raiva na forma paralítica ou furiosa (encefálica) onde no ser humano é a forma mais frequente em 80% dos casos, assim como nos canídeos e felídeos de forma geral (KOTAIT et al, 2015). Hidrofobia (sintoma mais específico da raiva), aerofobia, fotofobia e agressividade são os sintomas mais comum (FOOKS & JACKSON, 2020; INSTITUTO PASTEUR, 2009). Há relatos de pessoas infectadas com comportamento de morder (EMMONS et al, 1973; DUPONT & EARLE, 1965).

Em humanos, quadros de excitabilidade, ansiedade, apreensão, agitação, insônia, agressividade, depressão e febre alta são observáveis, e nos animais como canídeos e felídeos observa-se mudança de comportamento como o animal “atacando o vento”, as vezes mordendo o próprio corpo, demonstrando um sentimento de alerta constante, animais noturnos aparecem durante o dia (FOOKS & JACKSON, 2020; DAVIS et al, 2015; MACEDO et al, 2006). Com a progressão do quadro e a migração centrífuga dos vírus, inicia-se a intensa produção de saliva (rica em vírus) e início da fase de paralisia muscular, sendo os primeiros os músculos da deglutição como também a língua (INSTITUTO PASTEUR, 2009).

A fase paralítica é muito comum em ruminantes e possui uma forma gradativa de paralisia muscular, sendo essa flacidez muscular observada no começo da doença causando uma prostração de forma ascendente, o que causa muita confusão clínica com outras doenças, principalmente se a agressão que

causou a inoculação passou despercebida (MORI, 2020; INSTITUTO PASTEUR, 2009).

O primeiro relato de raiva parálitica em humanos foi descrito por Gamaleia (1887), com esta paralisia dos músculos da laringe há uma afonia nos enfermos, bem como tenesmo e incontinência urinária com relaxamento de esfíncteres, sendo esta primeira característica chamada de raiva muda nos humanos (FOOKS & JACKSON, 2020; KOTAIT et al, 2015).

Já em animais de campo é comum observar paresia de membros posteriores com flacidez dos músculos da mandíbula causando também uma sialorreia, esta flacidez progride para os membros dianteiros fazendo com que o animal fique em decúbito lateral realizando o movimento de pedalagem no intuito de se levantar (quadro muito característico em equídeos), porém a paralisia ocorre inicialmente nos músculos da respiração, ocasionando uma morte súbita, o que dificultará seu diagnóstico laboratorial devido a infecção no Sistema Nervoso Central não estar ainda bem instalada (FOOKS & JACKSON, 2020; INSTITUTO PASTEUR, 2009).

iii) Coma e morte – geralmente nos animais é bem rápida esta fase, causada pela grande fadiga gerada pelas fases i e ii e à falência de múltiplos órgãos afetados pela infecção como decorrente das lesões causadas no hipotálamo e troco encefálico (MORI, 2020). No ser humano, esta fase apresenta uma desregulação das funções fisiológicas tais como pressão arterial, ritmo cardíaco e respiratório; funções neurológicas com morte cerebral e/ou parada cardiorrespiratória, porém esta fase pode ser prolongada com o coma terapêutico induzido (KOTAIT et al, 2015).

Profilaxia

Devido uma alta taxa de letalidade da raiva (aproximadamente 100%), a principal ferramenta contra essa doença é a profilaxia através da imunização, isto se dá com vacina do vírus da raiva inativado produzido em ovos embrionados, bem como em cultivo celular (INSTITUTO PASTEUR, 2021).

A profilaxia é dividida em duas situações: i) pré-exposição – indicada para pessoas com frequência elevada de exposição ao vírus da raiva, realizada apenas com vacina antirrábica (INSTITUTO PASTEUR, 2021); e ii) pós-exposição – indicado para pessoas que possivelmente foram expostas ao vírus da raiva, quer seja por agressão de animais suspeitos, quer seja por acidente envolvendo exposição ao vírus (INSTITUTO PASTEUR, 2021).

No caso da profilaxia pós-exposição é necessário o uso de outros produtos como soro antirrábico (solução purificada de imunoglobulinas feito com soro de equinos hiper imunizados contra raiva) e imunoglobulina humana antirrábica, além de ter que passar por uma avaliação de gravidade do ferimento e da espécie do animal agressor (INSTITUTO PASTEUR, 2021).

Diagnóstico

O diagnóstico da raiva só é confirmado por exames laboratoriais, pois seu diagnóstico somente com os sinais clínicos pode ser confundido com qualquer outra doença nervosa como botulismo, tétano, febre do Nilo ocidental, encefalomielite equina, encefalopatia espongiforme bovina, entre outras. Para tanto, faz-se necessário a coleta de material (encéfalo e medula) que deverão ser enviados para o laboratório para posterior análise post-mortem. Cada amostra deverá acompanhar uma ficha de identificação que possuirá dados do animal, do proprietário, da propriedade, do veterinário responsável pela coleta. Esses dados servirão de base de informação para o sistema de vigilância epidemiológica que procederão com o saneamento de foco e controle da circulação viral caso positivo (OPAS, 2010).

O teste diagnóstico para raiva deve apresentar alta especificidade e sensibilidade, sendo hoje utilizada as técnicas de Imunofluorescência direta (IFD), isolamento viral em camundongos, isolamento viral em cultivo celular e exames de biologia molecular pela reação em cadeia da polimerase (WHO, 2018; BRASIL, 2008; BRASIL, 2002).

O teste de imunofluorescência direta consiste de exame do tipo antígeno anticorpo, onde são utilizadas imunoglobulinas antirrábicas associadas com isotiocianato de fluoresceína (conjugado antirrábico) reagindo com uma lâmina impregnada com fragmentos de tecido nervoso do animal suspeito (BRASIL, 2008).

Após a reação, a lâmina é submetida ao exame de microscopia fluorescente (com luz violeta), quando o material for positivo, os marcadores fluorescentes emitirão uma luz verde-maçã intensa. É um exame sensível, específico e, de certa forma, rápido em comparação às provas de isolamento viral. É uma prova considerada padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde e Organização Mundial de Saúde Animal (FOOKS & JACKSON, 2020; WHO, 2018).

Porém, a qualidade do exame de IFD está diretamente relacionado com a qualidade da amostra (grau de autólise da amostra), qualidade do conjugado antirrábico, qualidade do microscópio de fluorescência e destreza da pessoa que faz a leitura (SULTAN et al, 2021; FOOKS & JACKSON, 2020; BRASIL, 2008).

O isolamento viral por inoculação em camundongos consiste em fazer uma suspensão do tecido nervoso do animal suspeito e fazer a inoculação intracranial dessa suspensão em camundongos albino suíços de 21 dias de idade, com peso médio de 11 a 14 gramas. É um procedimento relativamente caro de ser implantado, pois necessita de um biotério, porém é um exame bem sensível, entretanto, pode ser muito demorado (até 30 dias) (MORI, 2020; BRASIL, 2008).

O isolamento viral em cultivo celular também é um teste de inoculação do vírus da raiva, porém utiliza células do tipo neuroblastoma murino (N2A) e conjugado antirrábico, que é submetido a um exame de microscopia fluorescente. É um exame mais barato que a inoculação em camundongos, porém exige uma estrutura para o cultivo das células, técnicos capacitados para realizar o cultivo e o exame, células com boa morfologia (MORI, 2020; BRASIL, 2008).

A detecção do RNA viral por meio de exames de biologia molecular através da reação em cadeia da polimerase seguida de transcrição reversa é outra alternativa muito sensível para diagnóstico complementar ao exame de IFD. Para

tanto é necessário equipamentos específicos, técnicos capacitados para a realização da extração do material genético, assim como para a realização da transcrição reversa e a PCR (SULTAN et al, 2021; MORI, 2020).

REFERÊNCIAS

- Badrane, H.; Tordo, N. Host switching in lyssavirus history from the chiroptera to the carnivora orders. *Journal of Virology*. n.75, p.8096-8104, 2001. doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001
- Batista, H. B. de C. R.; Franco, A. C.; Roehe, P. M. Rabies: a brief review. *Acta Scientiae Veterinariae*. v.2, n.35, p.125-144, 2007. doi.org/10.22456/1679-9216.15959
- Black, J. G.; Lawson, K. F. Sylvatic rabies studies in the silver fox. Susceptibility and immune response. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v.34, P.309–311, 1970.
- Blancou, J. Early methods for the surveillance and control of rabies in animals. *Revue Scientifique et Technique*. v.13, n.2, p.361-372, 1994. dx.doi.org/10.20506/rst.13.2.766
- Bones, V. C.; Gameiro, A. H.; Castilho, J. G.; Molento, C. F. M. Comparative Costs of the Mouse Inoculation Test (MIT) and Virus Isolation in Cell Culture (VICC) for Use in Rabies Diagnosis in Brazil. *Alternatives to Laboratory Animals*. v. 43, n. 2, p. 81–87, 2015. doi.org/10.1177/026119291504300203
- Brasil. Ministério da Saúde. Boletem Epidemiológico. Brasília, v.52, n. 48, 2021.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Diagnostico Laboratorial da Raiva / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.
- Brasil. Instrução Normativa nº05, de 1º de março de 2002. Aprova as Normas Técnicas para o controle da raiva dos herbívoros domésticos. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2002.
- Caraballo, D. A.; Lombardo, M. A.; Becker, P.; Sabio, M. S.; Lema, C.; Martínez, L. M.; Beltrán, F. J.; Li, Y.; Cisterna, D. M. Evaluation of Two Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Rabies Virus in Circulating Variants from Argentina: Influence of Sequence Variation. *Viruses*. v.1, n.23. 2021. doi.org/10.3390/v13010023
- Cardiff, R. D.; Ward, J. M.; Barthold, S. W. “One medicine—one pathology”: Are veterinary and human pathology prepared? *Lab. Investig.* v.88, p.18-26, 2008. doi:10.1038/labinvest.3700695
- CDC. Amplification methods, 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/amplification_methods.html>. Acesso em Outubro/2022.

Ceballos, N. A.; Morón, S. V.; Berciano, J. M.; Nicolás, O.; López, C. A.; Juste, J.; Nevado, C. R.; Setién, A. A.; Echevarría, J. E. Novel Lyssavirus in Bat, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. v.19, n.5. 2013. doi.org/10.3201/eid1905.121071

Centoamore, N. H. F.; Chierato, M. E. R.; Silveira, V. B. V.; Asano, K. M.; Iamamoto, K.; Fahl, W. O.; Scheffer, K. C.; Achkar, S. M.; Mesquita, L. P.; Maiorka, P. C.; Mori, E. Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil. *Journal of Virological Methods*. v.283, 2020. doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113918

Davis, B. M.; Rall, G. F.; Schnell, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But were Afraid to Ask). *Annu. Rev. Virol.* v.2, n. 3, 2015. doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157

Dietzgen, R. G., Kondo, H., Goodin, M. M., Kurath, G. and Vasilakis, N. The family Rhabdoviridae: mono and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res.* v.2, p.158–170, 2017. doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010

Dupont, J. R.; Earle, K. M. Human rabies encephalitis. A study of 97 fatal cases with a review of the literature. *Neurology*, n.15, 1023–1034p. 1965. doi.org/10.1212/WNL.15.11.1023

Eggerbauer, E.; Troupin, C.; Passior, K.; Pfaff, F. Höper, D.; Neubauer-Juric, A.; Haberl, S.; Bouchier, C.; Mettenleiter, T. C., Bourhy, H.; Müller, T.; Dacheux, L.; Freuling, C. M. The Recently Discovered Bokeloh Bat Lyssavirus: Insights Into Its Genetic Heterogeneity and Spatial Distribution in Europe and the Population Genetics of Its Primary Host. *Advances in virus research*. v.99, 2017. doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.07.004

Emmons, R. W.; Leonard, L. L.; DeGenaro Jr., F.; Protas, E. S.; Bazeley, P. L.; Giammona, S. T.; Sturckow, K. A case of human rabies with prolonged survival. *Intervirology*. V.1 n.1, p.60–72, 1973. doi.org/10.1159/000148833

Escobar, L. E.; Peterson, A. T.; Favi, M.; Yung, V. Medina-Vogel G. Bat-borne rabies in Latin America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v.57, n.1, p.63-72, 2015 doi: 10.1590/S0036-46652015000100009.

Favoretto, S. R.; de Mattos, C. C.; de Mattos, C. A.; Campos, A. C. A.; Sacramento, D. R. V.; Durigon, E. L. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. *Epidemiol. Infect.* v.141, p.1552–1561, 2013. doi:10.1017/S0950268813000198

Fisher, C. R.; Lowe, D. E.; Smith, T. G.; Yang, Y.; Hutson, C. L.; Wirblich, C.; Cingolani, G.; Schnell, M. J. Lyssavirus vaccine with a chimeric glycoprotein protects across phylogroups. *Cell Reports*, v.32, n.3, 2020. doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107920

Fooks, A. R.; Cliquet, F.; Finke, S.; Freuling, C.; Hemachudha, T.; Mani, R. S.; Müller, T.; Nadin-Davis, S.; Picard-Meyer, E.; Wilde, H.; Banyard, A. C. Rabies. *Nature Reviews/Disease Primers*. v.3 (17091), 2017. doi:10.1038/nrdp.2017.91

Fooks, A. R.; Jackson, A. C. Rabies: Scientific bases of the disease and its management. Londres: Elsevier. 4.ed. 2020.

Fu, Z. F.; Jackson, A. C. Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *Journal of Neurovirology*. v.11, n.1, p.101–106, 2005. doi.org/10.1080/13550280590900445.

Gamaleia, N. Etude sur la rage paralytique chez l'homme. *Annales de L'Institut Pasteur*. n.1, p.63–83, 1887.

Gomes, M. N.; Uieda, W., Latorre, M. R. D. O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) no estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. n. 26, p.38-43, 2006. doi.org/10.1590/S0100-736X2006000100008

Gluska, S.; Zahavi, E. E.; Chein, M.; Gradus, T.; Bauer, A.; Finke, S.; Perlson, E. Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathog*. v.10, n.8, 2014. doi:10.1371/journal.ppat.1004348

Hanlon, C. A. In: Jackson, A. C. (Ed). Rabies: Scientific Basis of the Disease and its Management. 3.ed. New York: Academic Press. p.179-213, 2013. doi.org/10.1016/B978-0-12-396547-9.00005-5

Hemachudha, T.; Ugolini, G.; Wacharapluesadee, S.; Sungkarat, W.; Shuangshoti, S.; Laothamatas, J. (2013). Human rabies: Neuropathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Neurology*. v.12, n.5, p.498–513, 2013. doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70038-3.

Hu, S. C.; Hsu, C. L.; Lee, M. S.; Tu, Y. C.; Chang, J. C.; Wu, C. H.; Lee, S. H.; Ting, L. J.; Tsai, K. R.; Cheng, M. C.; Tu, W. J.; Hsu, W. C. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*. v.24, n.4, p.782-785, 2018. doi: 10.3201/eid2404.171696

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/lyssavirus>> Acesso em: novembro de 2022.

Instituto Pasteur. Manual Técnico do Instituto Pasteur. São Paulo: Instituto Pasteur. n.8. 2009.

Instituto Pasteur. Norma técnica de profilaxia da raiva humana. São Paulo: Instituto Pasteur. 2021.

Iseni, F.; Barge, A.; Baudin, F.; Blondell, D.; Ruigrok, R.W.H. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *Journal of General Virology*. n.79, p.2909-2919, 1998. doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-2909

King, A. M. Q.; Adams, M. J.; Carstens, E. B.; Lefkowitz, E. J. Genus *Lyssavirus*. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Inc., p.696–699, 2012.

Kobayashi, Y.; Sato, G.; Mochizuki, N.; Hirano, S.; Itou, T.; Carvalho, A. A. B.; Albas, A.; Santos, H. P.; Ito, F. H.; Sakai, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research*. v.4, n.44, 2008. doi.org/10.1186/1746-6148-4-44

Kotait, I.; Carrieri, M. L.; Takaoka, N. Y. *Tratado de infectologia*. Veronesi, R.; Focaccia, R. Raiva. São Paulo: Atheneu; 5.ed. 2426.p, 2015.

Kotait, I.; Carrieri, M. L.; Takaoka, N. Y. Raiva – Aspectos gerais e clínica. *Manuais Instituto Pasteur*. São Paulo: Instituto Pasteur, v.8, p.49, 2009.

Li, C., Zhang, H., Ji, L., Wang, X., Wen, Y., Li, G. and Yang, Y. Deficient incorporation of rabies virus glycoprotein into virions enhances virus-induced immune evasion and viral pathogenicity. *Viruses*. v.11, n.218, 2019. doi.org/10.3390/v11030218

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. Diagnosis of Human Rabies Cases by Polymerase Chain Reaction of Neck-Skin Samples. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 10, n. 5, 2006. doi.org/10.1590/S1413-86702006000500008

MacLachlan, N. J.; Dubovi, E. J. *Fenner's Veterinary Virology*. 5.ed. Londres: Elsevier, 507p, 2016.

Moore, S.; Gilbert, A.; Vos, A.; Freuling, C. M.; Ellis, C.; Kliemt, J.; Müller, T. Rabies virus antibodies from oral vaccination as a correlate of protection against lethal infection in wildlife. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. v.2, n.31, 2017. doi.org/10.3390/tropicalmed2030031.

Mori, E. Raiva. In: Veronesi-Focaccia (Ed.). *Tratado de Infectologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, p. 937–964, 2020.

Ogura, T.; Tsuchiya, A.; Minas, T.; Mizuno, S. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. *BMC Res Notes*. v.8, n.644, 2015. doi.org/10.1186/s13104-015-1627-5

OPAS. Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. Cooperação Técnica MAPA/OPAS/PANAFTOSA para o Fortalecimento dos Programas de Saúde Animal do Brasil. Rio de Janeiro: PANAFTOSA -OPAS/OMS, 2010.

Reddy, G. B. M.; Krishnappa, S.; Vinayagamurthy, B.; Singh, R.; Singh, K. P.; Saminathan, M.; Sajjanar, B.; Rahman, H. Molecular epidemiology of rabies virus circulating in domestic animals in India. *Virus Dis.* v.29, n.3, 2018. doi.org/10.1007/s13337-018-0478-9

Rocha, S. M.; Oliveira, S. V.; Heinemann, M. B.; Gonçalves, V. S. P. Epidemiological Profile of Wild Rabies in Brazil (2002–2012). *Transboundary and Emerging Diseases.* 2015. doi:10.1111/tbed.12428

Roth, M. T.; Hoffner, H. A.; Michalowski, P. *Law collections from Mesopotamia and Asia minor.* Atlanta: Scholars Press, 2.ed. v.6, 1997.

Rupprecht, C.E.; Plotkin, S.A. Rabies vaccines. In *Vaccines.* London: W.B. Saunders. 6.ed. p.646–668, 2013.

Schnell, M. J.; Mcgettigan, J. P.; Wirblich, C.; Papaneri, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews – Microbiology.* v.8, p.51-61, 2010. doi.org/10.1038/nrmicro2260

Soulebot, J. P.; Brun, A.; Chappuis, G.; Guillemin, F.; Petermann, H. G.; Precausta, P.; Terre, J. Experimental rabies in cats: Immune response and persistence of immunity. *The Cornell Veterinarian.* v.71, n.3, p.311–325, 1981.

Steele, J. H. History of rabies. In: *The Natural History of Rabies.* 2.ed. Boca Raton: RCR Press. p.1-29, 1991.

Sultan, S.; Ahmed, S. A. H.; Abdelazeem, M. W.; Hassan, S. Molecular characterisation of rabies virus detected in livestock animals in the southern part of Egypt during 2018 and 2019. *Acta Veterinaria Hungarica.* V.69, n.1, p.80-87, 2021. DOI: 10.1556/004.2021.00005

Tarantola, A. Four thousand years of concepts relating to rabies in animals and humans, its prevention and its cure. *Tropical Medicine and Infectious Disease,* v.2, n.5, 2017. doi.org/10.3390/tropicalmed2020005.

Wada, M. Y.; Rocha, S. M.; Maia-Elkhoury, A. N. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde.* v.4, n.20, p.509-518, 2011. doi.org/10.5123/S1679-49742011000400010

Wadhwa, A.; Wilkins, K.; Gao, J.; Condori, R. E.; Gigante, C. M.; Zhao, H. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. *Plos. Negl. Trop. Dis.* v.11, n.1, 2017. doi:10.1371/journal.pntd.0005258

Wang, Z.; Chen, P.; Xie, P. *History and Development in Traditional Chinese Medicine.* Beijing: Science Press/ Amsterdam: IOS Press/Tokyo: Ohmsha. v.1, 287p, 1999.

WHO. Rupprecht, C. E.; Fooks, A. R.; Abela-Ridder, B. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: World Health Organization. 5.ed, v.1, 2018.

WHO. First annual progress report: Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-mediated Rabies by 2030. Geneva: World Health Organization. 2019.

Wunner, W. H.; CONZELMANN, K. Rabies. In: FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. (Eds.). Rabies Virus. 4. ed. Elsevier, p. 43–81, 2020.

Wunner, W. H. Rabies virus. In: Jackson, A. C., Wunner, W. H. Rabies. 2. Ed. San Diego: Academic Press. 2007.

Yuhong, W. Rabies and rabid dogs in Sumerian and Akkadian literature. Journal of the American Oriental Society. n.121, v.1, p.32-43, 2001. doi.org/10.2307/606727

CAPÍTULO 2 – Epidemiological aspects of rabies in focus areas in the State of Maranhão.

Original article

Epidemiological highlights regarding rabies virus in a Legal Amazon region - Maranhão, Brazil

Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita^{1*}, Washington Carlos Agostinho², Ana Karoline Sousa Mendes Simas¹, Lídio Lima Neto³, Enio Mouri⁴, Paulo Eduardo Brandão², Francisco Borges Costa¹

¹ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Maranhão, CEP 65055-310, São Luís - MA, Brazil.

² Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brazil

³ Virology Laboratory, CEUMA University, CEP 65075-120, São Luís - MA, Brazil

⁴ Instituto Pasteur de São Paulo, CEP 01311-000, São Paulo - SP, Brazil

ABSTRACT. Samples from 62 animals such as cattle, horses, dogs, cats, foxes and bats were sent to the official virology laboratory for rabies and reanalyzed using PCR and fluorescent antibody test (FAT) for the diagnosis of rabies in the state of Maranhão, Brazil. 46 samples were positive in IDF and 39 in PCR, and of these positive samples, 11 were viable for genetic sequencing, of which five detected a variant of *Cerdocyon thous* and six detected a variant of *Desmodus rotundus*. This study shows that rabies virus variants of *C. thous* and *D. rotundus* are circulating and distributed in the Amazon and Cerrado areas in the State of Maranhão.

INTRODUCTION

Rabies is a viral disease that affects the central nervous system of mammals. Due to its high fatality rate, estimated at approximately 100% of reported cases, it is considered a significant global concern. There is great interest in studying this disease because of its wide range of reservoirs and the substantial economic losses it causes, particularly in livestock farming, with a high incidence rate, especially in developing countries in South America, Asia, and Africa (Escobar et al., 2015; Gigante et al., 2018; Bitek et al., 2019; Naji et al., 2020; Sultan et al., 2021). Certain countries in Latin America and the Caribbean have achieved remarkable success in controlling urban rabies, leading to a reduction in human rabies cases transmitted by dogs during the beginning of this century. However, there has been an increase

in human cases caused by wildlife, specifically bats and canids, as well as losses in production animals (Kobayashi et al., 2008; Carnieli et al., 2009; Castilho et al., 2010; Wada et al., 2011; Mani & Madhusudana, 2013).

Hematophagous bats play a crucial role in the spread of the rabies virus due to their ability to fly. Particularly in the Americas, they have become the main transmitters of the disease (Schneider et al., 2009; PAHO, 2022). In the Amazon (the world's largest tropical rainforest), the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) is often responsible for cases of rabies in humans and production animals (Rosa et al., 2006; Sato et al., 2006; Kobayashi et al., 2008; Schneider et al., 2009; Escobar et al., 2015; Rocha et al., 2015; WHO, 2018a). These cases occur when non-biological factors such as deforestation, illegal mining, wildfires, large-scale livestock farming, or human encroachment into the forest disrupt the ecological balance, transforming the natural landscape into an anthropogenic one within the range of the natural focus of rabies (Schneider et al., 2009; Rocha et al., 2015; Aguiar et al., 2020; Brazil, 2021).

Similarly, to bats, wild canids also experience ecological imbalances in their niches, although they tend to be more tolerant of human activities compared to bats. In Brazil, there are two subfamilies within the Canidae family: i) Subfamily *Symocyoninae*: Represented by *Speothos venaticus* (bush dog); ii) Subfamily *Caninae*: Represented by *Cerdocyon thous* (crab-eating fox, bush dog, common fox, hoary fox), *Lycalopex vetulus* (hoary fox), *Chrysocyon brachyurus* (maned wolf), *Pseudalopex gymnocercus* (pampas fox), and *Atelocynus microtis* (short-eared dog). Among these species, *Cerdocyon thous* is the main reservoir of rabies in the northeastern region of Brazil (Beisiegel et al., 2013; Rocha et al., 2015; Brazil, 2021).

The areas where human and companion animal rabies cases occur, situated in a transition region between the Amazon and Cerrado biomes, are constant hotspots for the disease, as the rabies virus is always circulating. Therefore, this study aimed to identify rabies virus variants in samples from domestic and wild animals collected between 2015 and 2022. These samples were sent by the surveillance agencies of the state of Maranhão to the LACEN-MA reference rabies

laboratory. The objective was to determine the virus variants through genetic sequencing in order to enhance active and passive surveillance efforts.

MATERIALS AND METHODS

Collection of biological material

A total of 62 samples of the central nervous system (CNS) from animals suspected of having rabies were collected. The sampled species included cattle, dogs, cats, horses, donkeys, foxes, vampire bats, and non-vampire bats. These samples were obtained as part of epidemiological surveillance activities conducted by state government authorities. The samples were collected in two stages: i) Samples sent to the virology laboratory at the State University of Maranhão from 2015 to 2020. These samples exclusively consisted of samples that tested positive for the fluorescent antibody test (FAT) or the mouse inoculation test (MIT); ii) Samples sent to the rabies laboratory at the Oswaldo Cruz Institute/Central Public Health Laboratory of Maranhão (IOC/LACEN) from 2020 to 2022. These samples included both positive and negative samples for FAT and MIT. All samples were sent by the epidemiological surveillance agencies *in natura*, refrigerated, or frozen. The complete data of the samples can be found in Table 01. Genetic sequencing was performed on all positive samples.

Fluorescent Antibody Test (FAT)

For the FAT technique, imprints of nerve tissue were made on specific slides and allowed to dry at room temperature for 15 minutes. After the initial drying, the slides were fixed by immersing them in 100% acetone at -20°C for 45 minutes. Following this, the slides were allowed to dry again at room temperature. Next, the designated areas on the slides were incubated with the rabies conjugate IP CAR RNP from the Pasteur Institute in São Paulo, Brazil. This conjugate consists of rabies-specific immunoglobulins labeled with fluorescein isothiocyanate. The incubation was carried out in a humid chamber for 30 minutes. Subsequently, the slides were immersed in phosphate-buffered saline (PBS) for five minutes (2x) and distilled water for five minutes (1x) before being left to dry at room temperature.

Once this step was completed, the slides were mounted with coverslips and examined under an immunofluorescence microscope for analysis (WHO, 2018b; Petersen & Rupprecht, 2011).

RNA extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using the Qiagen Mini Kit (250) extraction kit, following the manufacturer's instructions. The extraction was performed in São Luis, Maranhão, Brazil. The sample consisted of portions of the central nervous system (CNS) for diagnostic analysis, and approximately 30 mg of the biological material was utilized. For sample maceration, a hemolysis tube and a glass rod were used. A decision was made not to use a mortar and pestle due to the small sample size, and maceration in the tube was deemed easier due to the small quantity of material being used (Sultan et al., 2021). To ensure the integrity of the RNAs, a reducing agent (1% β -mercaptoethanol in the volume of the lysis buffer) was added. This was done because tissue homogenization leads to the release of endonucleases, which can decrease the quantity and quality of RNA molecules, as described by Ogura et al., (2015). For optimal maceration, the material was worked with while still frozen. After the initial grinding, a mixture of lysis buffer (200 μ L) and reducing agent (2 μ L) was added to initiate the extraction process. To achieve better homogenization of the resulting solution (lysed tissue), five passes were made using a sterile syringe with a 0.8 mm diameter needle. After the extraction process, the resulting substance was eluted in 60 μ L of RNase-free water and stored in a -70°C freezer until further use.

The reverse transcription was performed using the Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, following the manufacturer's instructions. For this purpose, the total RNAs obtained from the sample extraction used in the FAT were utilized.

Table 01 Data from biological samples of animals suspected of rabies between the years 2015 to 2022 in the State of Maranhão, Brazil.

Sample ID	Year	Species	Location
3277	2015	Cattle	São Domingos do Maranhão
3278	2015	Cattle	São Domingos do Maranhão
3285	2015	Dog	Viana
3397	2016	Cattle	São Domingos do Maranhão
3401	2016	Cattle	São Joao do Paraíso
3403	2016	Cattle	Presidente Dutra
3419	2017	Horse	Santa Rita
3432	2017	Dog	Santa Inês
3477	2018	Cattle	Icatu
3483	2018	Horse	Icatu
3492	2018	Cattle	Apicum Açú
3493	2018	Dog	São Joao Batista
3495	2018	Horse	Icatu
3514	2018	Cattle	Axixá
3516	2018	Dog	Santa Inês
3480	2019	Horse	Icatu
3562	2019	Fox	Caxias
3565	2019	Fox	Icatu
3574	2019	Cattle	Olho D'água das Cunhas
3576	2019	Fox	Icatu
3577	2019	Fox	Icatu
3580	2019	Dog	São Domingos do Maranhão
3581	2019	Cattle	São Domingos do Maranhão
3582	2019	Cattle	Guimarães
3588	2019	Cattle	Itapecuru Mirim
3594	2019	Fox	Icatu
3597	2019	Horse	Barreirinhas
3515	2019	Dog	Santa Inês
3607	2019	Cattle	Caxias
3613	2019	Cattle	Guimarães
3617	2019	Fox	Matões do Norte
3632	2020	Fox	Caxias
3634	2020	Fox	Caxias
200101000017	2020	Cattle	Mirinzal
210101000007	2021	Cattle	Matões
210101000008	2021	Cattle	Bacuri
210101000016	2021	Cattle	Parnarama
211422000001	2021	Fox	Santa Inês
210101000019	2021	Cattle	Guimarães
MNH01/21	2021	Molossus sp	Morros
210101000020	2021	Artibeus sp	Caxias
210101000021	2021	Cattle	Guimarães
210101000023	2021	Cattle	Guimarães
210101000025	2021	Cattle	Bom Jesus das Selvas
210101000025	2021	Cattle	Bom Jesus das Selvas
210101000026	2021	Cattle	Bom Jardim
210101000027	2021	D. rotundus	Cururupu
210101000030	2021	Cattle	Bom Jesus das Selvas
210101000029	2021	Cat	São Luís
220151000042	2022	Dog	São Luís
220101000002	2022	Horse	Bom Jesus das Selvas
220101000006	2022	Cattle	Tuntum
220151000128	2022	Dog	São Luís
220101000005	2022	Cattle	Gov. Eugenio de Barros
220151000164	2022	Dog	São Luís
221655000001	2022	Dog	Timon
220101000003	2022	Cat	Chapadinha
220101000003	2022	Cat	Chapadinha
220151000408	2022	Dog	São Luís
220151000409	2022	Dog	São Luís
220151000410	2022	Dog	São Luís
MHN01/22	2022	Molossus sp	São Luís

The RT-PCR was conducted following the established protocol described by Caraballo et al. (2021). The primer pairs used in the reaction were as follows: the 504 primer (sense: 5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTGCGACT-3', corresponding to positions 1290-1317 of the viral genome) and the 304 primer (antisense: 5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT-3', corresponding to positions 1514-1533 of the viral genome). These primers amplify a 240-bp fragment.

For this step, 15µL of total RNA obtained from the extraction process was utilized. A reverse transcription mix was prepared, which included 8µL of 5X RT buffer, 6µL of a pool of dNTPs at a concentration of 10mM, 5µL of the primer at a concentration of 10µM, 400 units of reverse transcriptase (10.5µL), and 5.5µL of RNase-free water, resulting in a final volume of 50µL. The mix was then placed in the thermocycler and subjected to the time and temperature conditions specified in Table 02. The Challenge Virus Standard (CVS) strain CVS IP 02/19 (titer 1x10⁵) was employed as the positive control, while RNase-free water was used as the negative control.

Table 02 Thermal cycler programming for PCR: number of cycles, temperature and time conditions.

Program Steps	Number of Cycles	Temperature	Time
Denaturation	1	94°C	5 minutes
Denaturation	35	94°C	45 seconds
Hybridization	35	55°C	45 seconds
Extension	35	72°C	2 minutes
Extension	1	72°C	10 minutes

The material resulting from this RT-PCR was subjected to 1% agarose gel electrophoresis with 1X TBE buffer (0.1 M Tris, 0.09 M boric acid, and 0.001 M EDTA). Ethidium bromide was also included, using 7µL per 100 ml of buffer. The remaining material was stored in a freezer at -20°C.

Sequencing analysis of the viable samples of the N gene of RABV

The PCR product was purified using the GFX kit (Amersham Biosciences) following the manufacturer's recommendations. Subsequently, the sequencing

reaction was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) and purified using the Sephadex kit (Amersham Biosciences). The sequences were determined using an automated sequencer (ABI Prism 3100 - Applied Biosystems). Two sequencing reactions were performed for each sample, one in the sense direction and the other in the antisense direction. Each sequence was reviewed using the Chromas 2.24 software (©1998-2004 Technelysium Pty Ltd), and the complete sequence was obtained using the BioEdit 7.0.0 software (©1997-2004 Tom Hall). The sequences produced in this study will be submitted to GenBank for publication

Phylogenetic Analysis

The nucleotide sequences obtained were aligned with those available in GenBank using the ClustalW program within BioEdit 7.0.0. The alignment resulted in sequences of approximately 1360 nucleotides. The phylogenetic tree was generated using the distance method with the neighbor-joining algorithm and the MCL substitution model, with 100 bootstrap repetitions, using the Mega11.0.11 software (Tamura, Stecher, and Kumar, 2021).

RESULTS

Reported rabies samples in animals.

A total of 62 samples were evaluated using the fluorescence antibody technique. These samples were collected from various animal species including 27 cattle, 13 dogs, 9 foxes, 6 horses, 3 cats, and 4 bats (3 non-hematophagous and 1 hematophagous) between 2015 and 2022. Among these samples, 46 (74%) tested FAT positive, including 25 cattle, 7 dogs, 9 foxes, and 5 horses. However, the samples from cats and the 4 bats tested negative.

Out of the total samples analyzed by PCR, 63% (39/62) tested positive. Among the positive samples detected by PCR, 85% (39/46) were also positive when compared to the results of the positive samples obtained by FAT. However, 19% (3/16) of the samples that tested negative by FAT were found to be positive by PCR.

On the other hand, 22% (10/46) of the samples that were positive by FAT did not show positive results in the PCR analysis, as shown in Table 02.

Table 03 Results of fluorescence antibody test (FAT) and reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) in samples of the central nervous system (CNS) from suspected animals with rabies from 2015 to 2022 in the state of Maranhão, northeastern Brazil.

Species	Samples	FAT	RT-PCR
		+/-	+/-
Cattle	27	25/2	22/5
Fox	9	9/0	9/0
Dog	13	7/6	5/8
Horse	6	5/1	3/3
Cat	3	0/3	0/3
Non-hematophagous bat	3	0/3	0/3
Hematofagous bat	1	0/1	0/1
Total	62	46/16	39/23

The presence of rabies foci was evident in the Amazonian biome, accounting for 61% (n = 28/46) of the cases, while the Cerrado biome within Maranhão state accounted for 39% (n = 18/46) of the cases.

Phylogenetic Sequencing

Out of the positive samples, only 28% (11/39) were suitable for sequencing, resulting in the identification of two distinct variants as depicted in the phylogenetic tree based on partial sequencing of the N gene (Table 03). The topology of the phylogenetic tree (Figure 01) clearly displayed two distinct clusters: i) A lineage composed of strains associated with hematophagous bats, predominantly found in the Amazon biome; ii) A lineage consisting of strains associated with wild canids, primarily observed in the Cerrado biome.

Table 04 Results of central nervous system (CNS) samples from suspected animals with rabies, viable for phylogenetic sequencing, were analyzed according to reservoir species, virus variant, and biomes from 2015 to 2022 in the state of Maranhão, northeastern Brazil.

Samples ID	Species	Variant	Biomes	
			Amazon	Cerrado
3432	Dog	<i>Cerdocyon thous</i>	+	
3562	Fox	<i>Cerdocyon thous</i>		+
3565	Fox	<i>Cerdocyon thous</i>	+	
3617	Fox	<i>Cerdocyon thous</i>		+
3632	Fox	<i>Cerdocyon thous</i>		+
3492	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>	+	
210101000008	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>	+	
210101000016	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>		+
200101000017	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>	+	
210101000023	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>	+	
210101000025	Cattle	<i>Desmodus rotundus</i>	+	

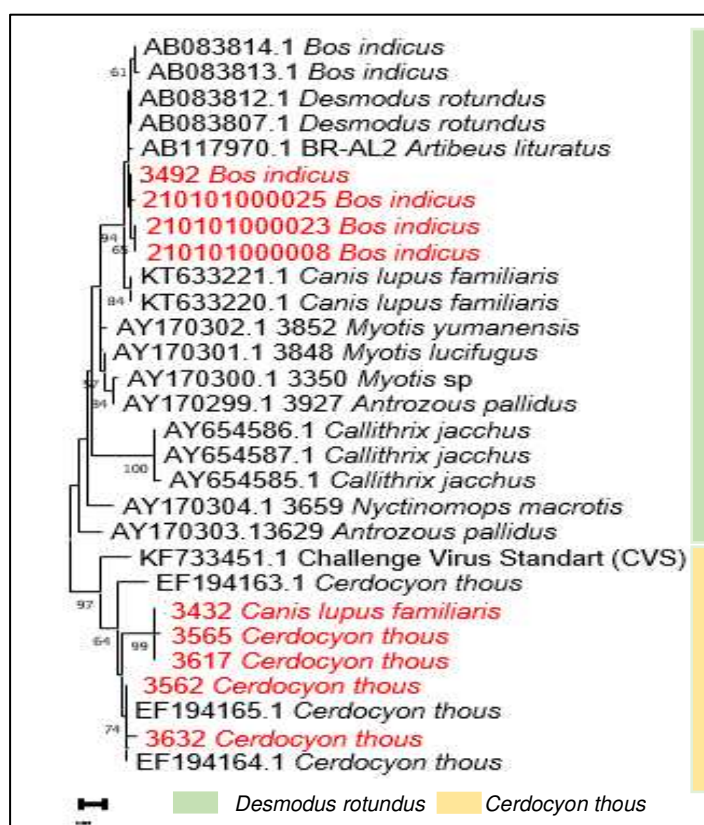


Figure 01 Phylogenetic tree based on the sequencing viable samples of the Rabies virus N gene. Distance method was used, with Neighbor-Joining Algorithm, MCL substitution model, and 1000 bootstrap repetitions with MEGA Software 11.0.11.

Based on the variants and georeferencing of the samples in this study, a map was generated to illustrate the extensive spread of rabies cases. The map highlights that cattle in the Amazon biome were more affected by bat-associated rabies variants, whereas wild canids and dogs exhibited a higher occurrence of rabies caused by the wild canid variant in the Cerrado biome (Figure 02).

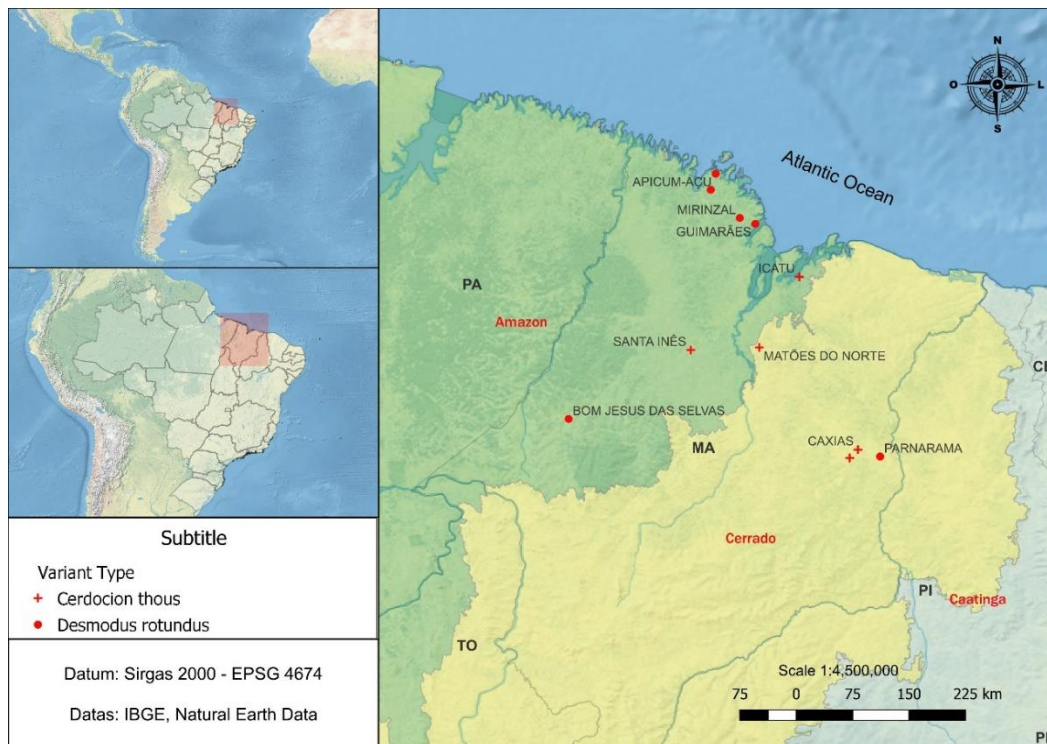


Figure 02 Geographic distribution of rabies virus variants in the State of Maranhão, Brazil. Each color on the map represents a specific biome: green for Amazon, wheat for Cerrado, and gray for Caatinga (highlighted in red). The names of the cities are indicated in black.

DISCUSSION

Despite rabies being a globally recognized disease with highly effective prophylaxis, an average annual mortality rate of 59,000 people worldwide is still observed solely due to dog-transmitted rabies, associated with a loss of 3.7 million Disability Adjusted Life Years (DALYs) due to premature deaths (WHO, 2018). Although dog-transmitted rabies remains a highly alarming reality in countries in Asia, Africa, and some Latin American countries such as Haiti (Wallace et al., 2016; Reddy et al., 2018; Sultan et al., 2021), in Brazil, dogs have ceased to be the main reservoir since the beginning of the 21st century, following an outbreak of vampire bat-transmitted rabies (*Desmodus rotundus*) in the states of Pará in 2004, resulting in 21 deaths, and in Maranhão in 2005, with 24 deaths (Rosa et al., 2006; Wada et al., 2011; Rocha et al., 2015; Rodrigues et al., 2018; Brazil, 2021). In the Legal Amazon area, particularly in the state of Pará, there has been a significant increase in livestock production in the mid-2000s, which subsequently coincided with an increase in cases of vampire bat-transmitted rabies in both cattle and humans (Fernandes et al., 2013).

The state of Maranhão, located in a transitional zone between two major Brazilian biomes, the Legal Amazon and the Cerrado, exhibits a rich biodiversity where the circulation of two distinct variants of the rabies virus is observed in this study: the *Desmodus rotundus* variant in the Amazon biome, while the *Cerdocyon thous* variant shows a higher occurrence in the Cerrado biome.

The *D. rotundus* variant continues to be the main cause of rabies in cattle in Maranhão, as observed in other areas of the Amazon region (Fernandes et al., 2013; Escobar et al., 2015; Rodrigues et al., 2018). However, some positive samples from cattle and horses from both biomes using FAT and RT-PCR techniques did not succeed in sequencing, except for one cattle sample in the Cerrado biome, demonstrating its circulation in both biomes. Thus, the aerial cycle has shown to be extensive, drawing attention to both agricultural defense due to economic losses and public health, as this cycle has been responsible for the largest human rabies outbreak in the state of Maranhão (Sato et al., 2006; Kobayashi et al., 2008).

It is important to note that the profile of rabies in Brazil has shifted from the urban cycle, where transmission of the canine variant was more incident, to the sylvatic/aerial cycle, in which variants of wild canids, hematophagous and non-hematophagous bats are prominent (Gonçalves et al., 2018; Souza et al., 2016; Rocha et al., 2015; Favoretto et al., 2013; Rosa et al., 2006). This is highlighted in this study, where five samples (four from *Cerdocyon thous* and one from a domestic dog) tested positive for the wild canid variant. Of these samples, four were found in the Cerrado biome and one in the Amazon biome. It should be emphasized that the ecological niche of the bush dog includes open forest biomes such as fields, Cerrado, and Caatinga (Lemos et al., 2011; Souza et al., 2016; Brazil, 2021), where the highest occurrence of rabies due to the *C. thous* variant is observed in domestic, wild animals, and humans (Favoretto et al., 2013; Brazil, 2021).

This study highlights that 45% (5/11) of all sequenced samples tested positive for the wild canid variant (*Cerdocyon thous*) in the state of Maranhão, as several reports in the literature indicate a high prevalence of this variant in the Northeast region, especially in Ceará, Bahia, Rio Grande do Norte, Pernambuco, and Piauí (Favoretto et al., 2013; Souza et al., 2016; Gonçalves et al., 2018; Brazil, 2021).

Among these samples, one from a domestic dog tested positive in the municipality of Santa Inês (Amazon biome), which draws attention for two reasons: i - the first report of this variant in the Amazon biome, thus increasing its distribution, and ii - found in a domestic dog, as the reintroduction of the virus in dogs from the sylvatic cycle is an alert for epidemiological surveillance, as well as the conditions capable of allowing a variant from wild canids to adapt to dogs and subsequently transmit it to humans are still unknown (Favoretto et al., 2006; Slate et al., 2009; Rupprecht et al., 2015). Therefore, understanding the context of rabies virus transmission and its maintenance in natural environments among wild animals, as well as the bridge of the disease as a reemerging zoonosis, is of great importance (Wada et al., 2011; Favoretto et al., 2013; Rocha et al., 2015; Brazil, 2021).

It is observed that there is no specific distribution on the map regarding a particular variant for a specific biome, and this demonstrates that the rabies virus is dynamic in its dissemination in the state of Maranhão. It is worth noting that although

the results are very satisfactory for understanding the eco-epidemiology of the rabies virus to some extent, these data are likely to be underestimated, as the epidemiological surveillance practiced in the state cannot capture all cases of rabies within its territory. This problem is observed in several other locations that work with rabies notifications (Rocha et al., 2015; Gonçalves et al., 2018; WHO, 2018; Brazil, 2021; Sultan et al., 2021).

The occurrence of two variants of *D. rotundus* and *C. thous* in bats and foxes, respectively, with transmission to livestock, wildlife, and humans, highlights the epidemiological importance and the need to enhance regional surveillance, detection capacity, and response at the local health levels, as well as expand the provision of education to the population regarding the epidemiology, prevention, and control measures.

Conclusion

Variants of bats and wild canids circulate in a transitional area between the Amazonian and Cerrado biomes in the state of Maranhão, infecting both livestock and wild animals. These findings support regional epidemiological surveillance actions.

Author Contributions

Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita^{1*}, Washington Carlos Agostinho², Ana Karoline Sousa Mendes Simas¹, Lídio Lima Neto³, Enio Mouri⁴, Paulo Eduardo Brandão², Francisco Borges Costa¹

Conceptualization, data curation, investigation, formal analysis, visualization, writing and project administration: Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita and Francisco Borges Costa. Methodology: Eric Takashi Kamakura de Carvalho Mesquita, Washington Carlos Agostinho, Ana Karoline Sousa Mendes Simas, Paulo Eduardo Brandão, and Francisco Borges Costa.

Acknowledgments

We are grateful to the institutions that provided support for this survey: Laboratório de Referência do Estado do Maranhão (LACEN, MA); Universidade de São Paulo (USP). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão (FAPEMA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest in this research.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics Statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted in the journal's author guidelines page, have been adhered to, and the appropriate ethical review committee approval has been obtained. This study involved the targeted collection and examination of wild mammals and was approved by the Animal Experimental Ethics Committee (Project number: 16/2022).

REFERENCES

- Aguiar, L. M. S.; Pereira, M. j. R.; Zortéa, M.; Machado, R. B. Where are the bats? An environmental complementarity analysis in a megadiverse country. *Diversity and Distributions*. P.1-13, 2020. DOI: 10.1111/ddi.13137
- Beisiegel, B. M.; Lemos, F. G.; Azevedo, F. C.; Queirolo, D.; Jorge, R. S. P. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*. v. 3, n. 1, p.138-145, 2013.
- Bitek, A. O., Osoro, E., Munyua, P. M., Nanyingi, M., Muthiani, Y., Kiambi, S.; Thumbi, S. A hundred years of rabies in Kenya and the strategy for eliminating dog-mediated rabies by 2030. *AAS Open Res.* v.1, n.23, 2019. doi.org/10.12688/aasopenres.12872.2

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletem Epidemiológico. Brasília, v.52, n. 48, 2021.

Caraballo, D. A.; Lombardo, M. A.; Becker, P.; Sabio, M. S.; Lema, C.; Martínez, L. M.; Beltrán, F. J.; Li, Y.; Cisterna, D. M. Evaluation of Two Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Rabies Virus in Circulating Variants from Argentina: Influence of Sequence Variation. *Viruses*. v.1, n.23. 2021. doi.org/10.3390/v13010023

Carnieli, P.; Castilho, J. G.; Fahl, W. O.; Véras, N. M. C.; Carrieri, M. L.; Kotait, I. Molecular characterization of Rabies Virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. *Virus Research*, v.141, n.1, p.81-89, 2009. doi.org/10.1016/j.virusres.2008.12.015.

Castilho, J. G.; Carnieli, P. Jr.; Durymanova, E. A.; Fahl, W. O.; Oliveira, R. N.; Macedo, C. I.; da Rosa, E. S.; Mantilla, A.; Carrieri, M. L.; Kotait, I. Human rabies transmitted by vampire bats: antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from the Amazon region (Brazil and Ecuador). *Virus Res*. v.153, n.1, 2010. doi: 10.1016/j.virusres.2010.07.012.

Escobar, L. E.; Peterson, A. T.; Favi, M.; Yung, V.; Medina-Vogel, G. Bat-borne rabies in Latin America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v.57, n.1, p.63-72. 2015 doi:10.1590/S0036-46652015000100009

Favoretto, S. R.; Mattos, C. C.; Morais, N. B. Rabies Virus Maintained by Dogs in Humans and Terrestrial Wildlife, Ceará State, Brazil. *Emerg.infect. Dis.*, v.12, n.12, 1978-1981, 2006.

Favoretto, S. R.; de Mattos, C. C.; de Mattos, C. A.; Campos, A. C. A.; Sacramento, D. R. V.; Durigon, E. L. The emergence of wildlife species as a source of human rabies infection in Brazil. *Epidemiol. Infect.* v.141, p.1552–1561, 2013. doi:10.1017/S0950268813000198

Fernandes, M. E. B.; Costa, L. J. C. C.; Andrade, F. A. G.; Silva, L. P. Rabies in humans and non-human in the state of Pará, Brazilian Amazon, The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.17, n.2, 2013. doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.015

Gigante, C. M.; Dettinger, L.; Powell, J. W.; Seiders, M.; Condori, R. E. C.; Griesser, R.; Okogi, K.; Carlos, M.; Pesko, K.; Breckenridge, M.; Simon, E. M. M.; Chu, M. Y. J. V.; Davis, A. D.; Brunt, S. J.; Orciari, L.; Yager, P.; Carson, W. C.; Hartloge, C.; Saliki, J. T.; Sanchez, S.; Deldari, M.; Hsieh, K.; Wadhwa, A.; Wilkins, K.; Peredo, V. Y.; Rabideau, P.; Gruhn, N.; Cadet, R.; Isloor, S.; Nath, S. S.; Joseph, T.; Gao, J.; Wallace, R.; Reynolds, M.; Olson, V. A.; Li, Y. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. *Plos One*. V.13, n.5, 2018. doi.org/10.1371/journal.pone.0197074

Gonçalves, N. S.; Soares, P. S.; Santos, D. C. Epidemiological overview of human rabies in Brazil focusing on the southern region. *R Epidemiol Control Infec*. v.8, n.3, p.268-275, 2018. doi.org/10.17058/reci.v8i3.11270

Kobayashi, Y.; Sato, G.; Mochizuki, N.; Hirano, S.; Itou, T.; Carvalho, A. A. B.; Albas, A.; Santos, H. P.; Ito, F. H.; Sakai, T. Molecular and geographic analyses of vampire

bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. BMC Veterinary Research. v.4, n.44, 2008. doi:10.1186/1746-6148-4-44

Lemos, F. G.; Azevedo, F. C.; Costa, H. C. M.; May Junior, J. A. Human threats to hoary and crab-eating foxes in Central Brazil. Canid News. v.14, n.2, 2011. https://www.canids.org/canidnews/14/Hoary_and_crab-eating_foxes_in_Brazil.pdf

Mani, R. S.; Madhusudana, S. N. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. Scientific World Journal. v.14, 2013. doi: 10.1155/2013/569712

Naji, E., Fadajan, Z., Afshar, D. and Fazeli, M. 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. *Jap Jour of Infec Diseases*. v.73, p.19–25, 2020. doi:10.7883/yoken.JJID.2019.009

Ogura, T.; Tsuchiya, A.; Minas, T.; Mizuno, S. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. BMC Res Notes. v.8, n.644, 2015. doi.org/10.1186/s13104-015-1627-5

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Programa regional de raiva em herbívoros domésticos. 2022.

Petersen, B. W.; Rupprecht, C. E. Human rabies epidemiology and diagnosis. In: TKACHEV, S. (Ed). Non-Flavivirus encephalitis. Rijeka: IntechOpen. 374p., 2011. doi.org/10.5772/21708

Reddy, G. B. M.; Krishnappa, S.; Vinayagamurthy, B.; Singh, R.; Singh, K. P.; Saminathan, M.; Rahman, H. Molecular epidemiology of rabies virus circulating in domestic animals in India. *Virus Dis*. v.29, p.362–368, 2018. doi.org/10.1007/s13337-018-0478-9

Rocha, S. M.; Oliveira, S. V.; Heinemann, M. B.; Gonçalves, V. S. P. Epidemiological Profile of Wild Rabies in Brazil (2002–2012). *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015. doi:10.1111/tbed.12428

Rodrigues, E. D. L.; Freitas, T. A.; Paiva, F. A. S.; Pereira, A. S.; Coelho, T. F. S. B.; Rosa, E. S. T.; Casseb, A. R.; Casseb, L. M. N. Prevalence of animal rabies in Pará State, Brazil, from 2004 to 2013. *Rev Pan-Amaz Saude*. v.9, n.4, p.57-62, 2018. doi:10.5123/S2176-62232018000400006

Rosa, E. S. T.; Kotait, I.; Barbosa, T. F. S.; Carrieri, M. L.; Brandão, P. E.; Pinheiro, A. S.; Begot, A. L.; Wada, M. Y.; Oliveira, R. C.; Grisard, E. C.; Ferreira, M.; Lima, R. J. da S.; Montebello, L.; Medeiros, D. B. A.; Sousa, R. C. M.; Bensabath, G.; Carmo, E. H.; Vasconcelos, F. C. Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. v.12, n.8, 2006.

Rupprecht CE, Kuzmin IV. Why we can prevent, control and possibly treat – but will not eradicate – rabies. *Future Virol*. 10(5), 517-535, 2015.

Sato, G.; Kobayashi, Y.; Shoji, Y.; Sato, T.; Itou, T.; Ito, F. H.; Santos, H. P.; Brito, C. J. C.; Sakai, T. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Archives of Virology*. v.151, p.2243-2251, 2006. Doi:10.1007/s00705-006-0770-7

Schneider, M. C.; Romijn, P. C.; Uieda, W.; Tamayo, H.; da Silva, D. F.; Belotto, A.; da Silva, J. B.; Leanes, F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America?. *Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health*. v.25, n.3, 2009.

Slate, D.; Algeo, T. P.; Nelson, K. M.; Chipman, R. B.; Donovan, D.; Blanton, J. D.; Niezgoda, M.; Rupprecht, C. E. Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 3: e 549, 2009. doi:10.1371/journal.pntd.0000549

Souza, D. N.; Carnieli Jr, P.; Macedo, C. I.; Oliveira, R. N.; Batista, H. B. C. R.; Rodrigues, A. C.; Pereira, P. M. C.; Achkar, S. M.; Vieira, L. F. P.; Kawai, J. G. C. Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from canids in North and Northeast Brazil. *Arch Virol*. 2016. doi:10.1007/s00705-016-3079-1

Sultan, S.; Ahmed, S. A. H.; Abdelazeem, M. W.; Hassan, S. Molecular characterisation of rabies virus detected in livestock animals in the southern part of Egypt during 2018 and 2019. *Acta Veterinaria Hungarica*. V.69, n.1, p.80-87, 2021. DOI: 10.1556/004.2021.00005

Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* v.38, n.7, p.3022-3027, 2021 doi:10.1093/molbev/msab120

Wada, M. Y.; Rocha, S. M.; Maia-Elkhoury, A. N. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*. v.4, n.20, p.509-518, 2011. doi.org/10.5123/S1679-49742011000400010

Wallace R, Etheart M, Ludder F, Augustin P, Fenelon N, Franka R, Crowdis K, Dely P, Adrien P, Pierre-Louis J, Osinubi M, Orciari L, Vigilato M, Blanton J, Patel R, Lowrance D, Liverdieu A, Coetzer A, Boone J, Lindenmayer J, Millien M. The Health Impact of Rabies in Haiti and Recent Developments on the Path Toward Elimination, 2010-2015. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Oct;97(4_Suppl):76-83. doi: 10.4269/ajtmh.16-0647.

WHO, World Health Organization. Who Expert Consultation On Rabies. Geneva: WHO Press. 3.ed, 184p. 2018. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?ua51>.

WHO, World Health Organization. Rupprecht CE, Fooks, AR, Abela-Ridder B, editors. Laboratory techniques in rabies. 5.ed. vol.1. Geneva: World Health Organization, 2018.

**Capítulo 3 – Investigation of Wild Canid-Mediated Human Rabies Death,
Brazil, 2021**

Emerging Infectious Diseases

Impact fator: 16.162

Qualis CAPES: A1

Dispatch

Investigation of Wild Canid-Mediated Human Rabies Death, Brazil, 2021

Eric T. K. C. Mesquita*, Enio Mori, Carla I. Macedo, Karin C. Scheffer, Lídio G. L. Neto, Washington C. Agostinho, Paulo E. Brandão, Francisco B. Costa

Author affiliations: Laboratório de Raiva, Instituto Osvaldo Cruz (IOC)/Laboratório Central de Referência do Estado do Maranhão – (LACEN-MA), São Luís, MA, Brazil (E. T. K. de C. Mesquita, L. G. L. Neto); Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, São Luís, MA, Brazil (E. T. K de C Mesquita, F.B. Costa); Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil (E. Mori, C.I. Macedo, K.C. Scheffer); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil (W.C. Agostinho, P.E. Brandão).

CORRESPONDING AUTHOR: Francisco B Costa

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Departamento de Patologia do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brazil 65055-310.

Phone: +55-98-99191 1228; E-mail: francisco.costa@professor.uema.br

This work was carried out by the State University of Maranhão, São Luís - MA, Brazil; Rabies Laboratory, Central Reference Laboratory of the State of Maranhão - LACEN-MA, São Luís, MA, Brazil.; Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Keywords: *Lyssavirus*; wildlife; Maranhão

Abstract. We report a case of a 2-year-old boy who tragically succumbed to human rabies in northeastern Brazil. Initially, the child had a history of being attacked on the legs by a cat, as reported by the family on August 15th. The conditions persisted until the child unfortunately died on November 3rd, 2021. This patient exhibited

35 acute neurological symptoms, including euphoria, sialorrhea, aggressiveness, and
36 coma. Through Sanger sequencing, we confirmed, for the first time, a case of
37 human rabies linked to the wild canid variant in an Amazon-Cerrado transition area.
38 Additionally, our findings highlight the interrelationship between humans, the variant
39 virus, and animals. This underscores the impact on global public health in the
40 Amazon-Cerrado transition region on northeastern Brazil due reemergence of
41 rabies wild canids.

42

43 **Article Summary Line.** Human rabies detected in a child caused by a wild canid
44 variant in the countryside of Chapadinha city, Maranhão, Brazil.

45

46 **Text**

47 Rabies, caused by rabies virus (RABV), is one of the most common fatal
48 diseases with a widespread distribution in both the Eastern and Western
49 Hemispheres. It is associated with cases of dog bites in Asia, and Africa, and bats
50 in the Americas (1). The etiological agent is a neurotropic RNA virus belonging to
51 the order Mononegavirales, family Rhabdoviridae, subfamily Alpharhabdovirinae,
52 and genus Lyssavirus (2). The Amazon biome is considered an endemic region for
53 rabies, particularly after a human rabies outbreak in the states of Pará and
54 Maranhão (i.e., eastern amazon) in the first decade of the 21st century. Rabies has
55 a lethality rate that can reach 100% when no prophylactic treatment is administered,
56 and it is compulsory to report cases the Ministry of Health of Brazil (3-4).

57 On 3rd November 2021, a 2-year-old boy died, exhibiting acute neurological signs
58 such as euphoria, sialorrhea, aggressiveness, and coma following a supposed
59 allergic reaction to the polio vaccine. The person responsible for the child reported
60 that he had been attacked by a cat on the legs, and 35 days after the aggression,
61 the onset of nervous symptoms associate with the disease was observed.
62 Interestingly, the cat responsible for the attack is still alive. The child resides in the
63 rural area of the Chapadinha city in Maranhão, northeastern Brazil.

64 During an epidemiological investigation conducted after the case was reported, it
65 was discovered that a fox (*Cerdocyon thous*) exhibiting abnormal behavior had been
66 seen inside a house near the boy's residence during the daylight hours. Community
67 residents killed the fox and disposed of its carcass, making it impossible to conduct
68 a rabies test on the wild animal. However, this epidemiological link was the missing

69 piece to confirm the cause in this case. This is the first documented case of human
70 rabies associated with a wild canid in the eastern Amazon region of Brazil.

71

72 **The Study**

73

74 We hereby report a case of human rabies in a 2-year-old child who died on
75 November 3rd, 2021. Initially, there was a report of an attack by a cat on August
76 15th, 2021, as reported by the family. Without any apparent reason, the cat attacked
77 the boy on the legs. The child had not received pre-exposure prophylaxis (PrEP)
78 with the rabies vaccine. A little over a month after the animal's attack, the child
79 began experiencing symptoms such as lethargy, fever and asthenia, leading to
80 admission to the Emergency Care Unit (ECU) in Chapadinha City, Maranhão, Brazil.
81 However, the initial suspicion was an allergic reaction to the Poliomyelitis and
82 Pentavalent, Diphtheria, Tetanus, Whooping Cough, Hepatitis B and Haemophilus
83 Influenzae Type B vaccines, as the boy had received immunization three days
84 before. There was a previous report of the patient's animal aggression a month
85 before, and a blood serum sample was collected for rabies serology. On the same
86 day, the child was transferred to Children's Hospital "Dr. Odorico de Amaral Matos",
87 in the capital city of Maranhão, São Luís, Brazil. Due to the family's report that the
88 animal responsible for the aggression was still alive (35 days after the incident), the
89 medical assessment excluded the possibility of human rabies. Blood serum samples
90 from the patient were collected and subjected to serological tests for the diagnosis
91 of herpesvirus (IgG and IgM), toxoplasmosis (IgG and IgM), cytomegalovirus (IgG
92 and IgM), and human T-lymphotropic virus I and II. Additionally, RT-qPCR tests for
93 chikungunya and herpesvirus were performed. The patient tested positive only for
94 herpesvirus (kit: HSV 1/2 IgG – Liaison), while the results for other tests were
95 negative or undetectable. Following these examinations, the patient's clinical
96 condition was worsened, with neurological symptoms becoming more apparent,
97 including aggressiveness, euphoria, and sialorrhea. Due to the progression of these
98 clinical signs, the patient was referred to Mother and Child University Hospital with
99 suspected viral or bacterial encephalitis, as well as rabies. Blood serum,
100 cerebrospinal fluid (CSF), saliva, and nuchal skin biopsy samples were sent to
101 Pasteur Institute of São Paulo, the Brazilian rabies reference laboratory, for rabies
102 serological and molecular analysis.

103

104 On September 22nd, 2021, after receiving the first biological material from
105 this patient (blood serum), a case notification was made by the Surveillance, Alert
106 and Response in Public Health Emergencies of the Maranhão State (CIEV).
107 Subsequently, an epidemiological investigation was initiated at the probable site of
108 the aggression in the countryside of Chapadinha, MA. During the visit to the child's
109 residence, his grandfather mentioned that the child has been bitten by family's cat,
110 and there was also a fox present in the neighboring house. Although the cat was
111 suspected as the aggressor, it remained alive after 40th day since the attack, while
112 the fox was killed by the residents.

113 Blood serum and cerebrospinal fluid (CSF) were analyzed for rabies virus
114 neutralizing antibodies using the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) as
115 described in Table 1. For molecular analysis of viral RNA, saliva and hair follicle
116 samples were extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA,
117 USA) following the manufacturer's instructions. cDNA (genomic reverse
118 transcription) was synthesized using Superscript II reverse transcriptase (Life
119 Technologies, Carlsbad, CA, USA) with external primers Inicio (5'-
120 ACGCTTAACAACAARATCARAG -3') and P784 (5'-
121 CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA -3'). RABV amplicons (primary amplification) were
122 obtained by PCR using Inicio forward primer and P784 reverse primer. Heminested
123 amplification was performed using the external primer P784 and internal primer
124 NesC (5'- CGWATCAGGATTCCATAGCT -3'). After aligning the nucleotide
125 sequences, a phylogenetic tree was constructed using the distance neighbor-joining
126 method and the Maximum Composite Likelihood evolutionary model with 1,000
127 bootstrap replicates in the MEGA version 10.1.8 software. The isolated rabies virus
128 was found to cluster within the RABV genetic lineage associated with Brazilian
129 domestic dogs and wild canids (Figure 1). Additionally, the nucleotide sequences
130 exhibited a high level of identity (97%) with RABV sequences obtained from
131 Brazilian wild canids, specifically *Cerdocyon thous* (Genbank accession numbers:
132 AB362483 and KM594039).

133 After the worsening of clinical signs such as weakness, torpor, mydriasis,
134 fever, and loss of consciousness, the patient was transferred to the Intensive Care
135 Unit (ICU). Unfortunately, on the 94th day of the illness, the patient died.

136 **Conclusions**

137

138 The issue of human rabies in Latin America over the last three decades has
139 been highlighted due to the interrelation of time-geographical-reservoir. Many
140 human rabies cases have been diagnosed with different variants related to the
141 urban and sylvatic cycles throughout continental America, with cases recently in
142 Haiti, where the urban cycle still is involved (5-8).

143 When focusing on Brazil, the detection of the variant 2 (dog-related) has
144 dramatically decreased due to effective vaccination programs. Instead, variant 3
145 (bat-related) have become prominent in recent cases of human rabies in the
146 country, playing an important role as reservoirs in the sylvatic cycle (9). According
147 to reports by Rocha et al., (2015), between 2002 and 2012, more than hundreds of
148 cases of human rabies were reported in Brazil, with lethality rate exceeding 99%.
149 The sylvatic epidemiological cycle of the disease, associated with more than 65%
150 of cases, stands out, while the urban cycle accounted for less than 32% of the cases,
151 out of which only 3% were transmitted by unknown species. It is important to
152 highlight that over the last three decades, many researchers throughout Brazil have
153 been alerting to cases of human rabies involving sylvatic cycles (10).

154 In this narrative, we present a timeline of a case likely linked to a fox bite, with
155 an initial history of aggression by a cat. The outcome of the case was determined
156 through molecular diagnosis of the wild-canids variant virus, as confirmed by
157 sequencing saliva and hair follicle samples, in addition to an epidemiological
158 investigation (Figure 2). This recent episode of human rabies in a transition Amazon-
159 Cerrado area, in the microregion of Chapadinha, has highlighted the potential risk
160 of contracting the disease in the rural area due to lack of information among the
161 local population, healthcare workers, and authorities. Furthermore, it emphasizes
162 that rabies virus is circulating into wildlife canids in the Maranhão State.
163 Epidemiological surveillance and health education are extremely important in these
164 endemic areas, given the absence of rabies prophylaxis for these wild animals. This
165 underscores the need for actions similar to those carried out in the USA and Europe
166 concerning the sylvatic cycle, especially focusing on foxes.

167

168 **Acknowledgments**

We are grateful to AGED – MA (Chapadinha); LACEN-MA, Zoonosis Department of the Maranhão for their help in performing the epidemiological investigation. This work received financial support by CAPES, and FAPEMA.

Dr. Francisco B Costa is a Veterinary, Professor at Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), and work in the Parasitology Laboratory, PPGCA / UEMA, São Luis, MA. His main research interests are vector-borne diseases and zoonosis.

References

1. Wilde H, Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Tepsumethanon V. Rabies in Asia: the classical zoonosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012; published online June 8.
2. Oliveira, R. N.; Freire, C. C.; Iamarino, A.; Zanotto, P. M.; Pessoa, R.; Sabri S Sanabani, Sibeles Pinheiro de Souza, Juliana G Castilho, Helena B C R Batista, Pedro Carnieli Jr, Carla I Macedo, Jaqueline T Watanabe, Paulo E Brandão. Rabies virus diversification in aerial and terrestrial mammals. *Genet Mol Biol*. 2020 Jul 31;43(3):e20190370. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0370.
3. Wada, M. Y.; Rocha, S. M.; Maia-Elkhoury, A. N. Situação da raiva no Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*. v.4, n.20, p.509-518, 2011.
4. Kobayashi, Y.; Sato, G.; Mochizuki, N.; Hirano, S.; Itou, T.; Carvalho, A. A. B.; Albas, A.; Santos, H. P.; Ito, F. H.; Sakai, T. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Veterinary Research*. v.4, n.44, 2008.
5. Meynard, J. B.; Flamand, C.; Dupuy, C.; Mahamat, A.; Eltges, F.; Queuche, F.; Renner, J.; Fontanella, J. M.; Hommel, D.; Dussart, P.; Grangier, C.; Djossou, F.; Dacheux, L.; Goudal, M.; Berger, F.; Ardillon, V.; Krieger, N.; Bourhy, H.; Spiegel, A. First human rabies case in French Guiana, 2008: epidemiological investigation and control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1537. doi: 10.1371/journal.pntd.0001537.
6. Mani RS, Madhusudana SN. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *ScientificWorldJournal*. 2013 Nov 14;2013:569712. doi: 10.1155/2013/569712.
7. Escobar, L. E.; Peterson, A. T.; Favi, M.; Yung, V.; Medina-Vogel, G. Bat-borne rabies in Latin America. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 Jan-Feb;57(1):63-72. doi: 10.1590/S0036-46652015000100009.
8. Wallace RM, Etheart MD, Doty J, Monroe B, Crowdis K, Augustin PD, Blanton J, Fenelon N. Dog-Mediated Human Rabies Death, Haiti, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2016 Nov;22(11):1963-1965. doi: 10.3201/eid2211.160826.

9. Duarte NFH, Pires Neto RDJ, Viana VF, Feijão LX, Alencar CH, Heukelbach J. Clinical aspects of human rabies in the state of Ceará, Brazil: an overview of 63 cases. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021 Dec 17;54:e05092021. doi: 10.1590/0037-8682-0509-2021. PMID: 34932767; PMCID: PMC8687498.
10. Rocha SM, de Oliveira SV, Heinemann MB, Gonçalves VS. Epidemiological Profile of Wild Rabies in Brazil (2002-2012). *Transbound Emerg Dis.* 2017 Apr;64(2):624-633. doi: 10.1111/tbed.12428.

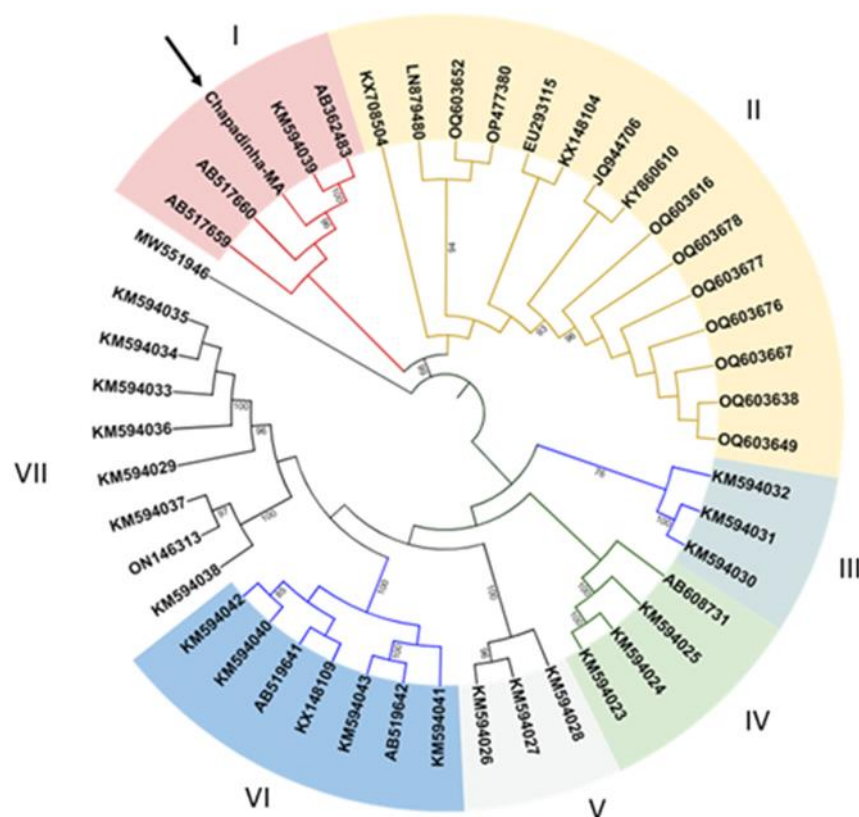


Figure 1. A neighbor-joining phylogenetic tree based on nucleotide sequences of the RABV N gene, showing clusters representing Brazilian wild canids and dog-related variants (I) and cosmopolitan variants (II). The human sample from this study is indicated by an arrow. Bootstrap values higher than 75% are displayed at the branches. European Bat Lyssavirus-1 (EBLV-1) was used as an outgroup. The tree was visualized using iTOL.

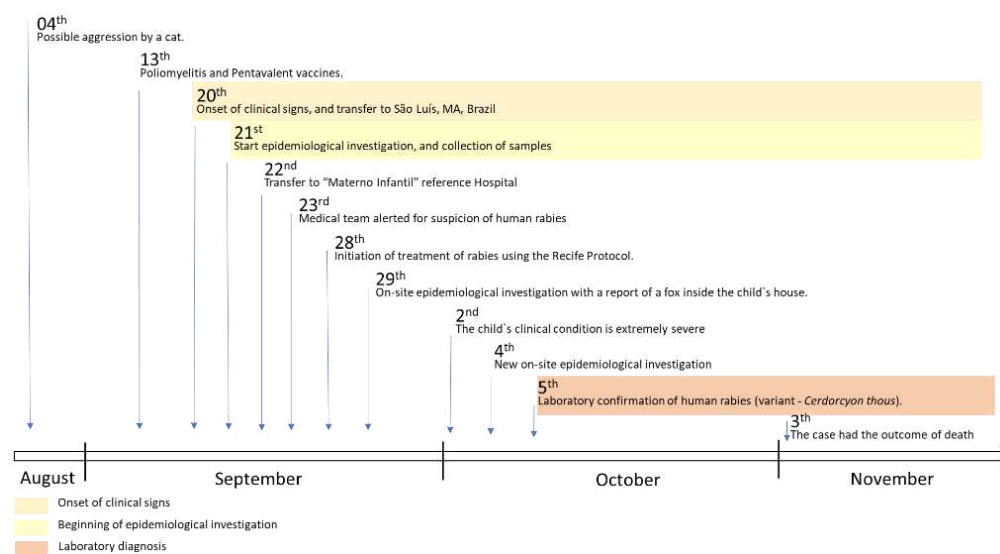


Figure 2 Timeline from surveillance to the outcome of the case.

Table 1 Changes in serum and cerebrospinal fluid (CSF) rabies virus neutralizing antibodies titers by Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT IU/mL).

Date	Serum	CSF
Sep 20, 2021	<0.02	
Sep 23, 2021		<0.02
Sep 28, 2021		0.05
Oct 14, 2021	3.27	0.06
Nov 11, 2021	5.11	