

Caracterização molecular do vírus da raiva isolado de *Desmodus rotundus* capturados no Estado do Rio de Janeiro

[Molecular characterization of rabies virus isolated from *Desmodus rotundus* captured in Rio de Janeiro State]

L.F.P. Vieira¹, S.R.F.G. Pereira¹, P.E. Brandão², R.N. Oliveira³, P. Carnieli-Junior³,
A.C. Galante¹, C.N. Chicarino¹, I. Kotait³

¹Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias - HV-UENF
Av. Alberto Lamego, 2000

28013-602 – Campos dos Goytacazes, RJ

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo, SP

³Instituto Pasteur – São Paulo, SP

RESUMO

Caracterizou-se filogeneticamente o vírus da raiva, isolado de morcegos hematógafos (*Desmodus rotundus*). Cento e noventa e nove *D. rotundus* foram capturados em cinco abrigos, no Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro e sul do Espírito Santo. Sete deles foram positivos para a raiva. Amostras desses vírus foram sequenciadas e comparadas com sequências provenientes de diversos estados brasileiros. As sequências de vírus da raiva isoladas, na região norte do Estado do Rio de Janeiro, mostraram características que as distinguem de amostras de vírus isoladas em outras regiões do país, no entanto foram idênticas às isoladas de bovinos no noroeste do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: vírus rábico, morcego hematófago, filogenética

ABSTRACT

Rabies samples isolated from vampire bats captured in the Rio de Janeiro State were phylogenetically analyzed. One hundred and ninety nine vampire bats were captured from five shelters from North and Northwest of Rio de Janeiro and South of Espírito Santo States. Seven of them were positive for rabies. These samples were sequenced and compared with rabies virus sequences from several Brazilian states. The sequences of rabies virus, isolated in the present work, from North of Rio de Janeiro State, showed characteristics that differ of the sequences isolated from bats from other Brazilian regions. However, they were identical to samples isolated from cattle in Northwest of Rio de Janeiro state.

Keywords: rabies virus, vampire bat, phylogenetic

INTRODUÇÃO

O vírus da raiva pertence à família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Esse gênero é dividido em sete genótipos: *Rabies virus* (vírus clássico da raiva), *Australian bat lyssavirus*, *Duvenhage virus*, *European bat lyssavirus I*, *European bat lyssavirus II*, *Lagos bat virus* e *Mokola vírus* (ICTVdb, 2008).

A raiva é uma doença enzoótica nos países em desenvolvimento (World..., 2004). No Brasil, ainda ocorrem muitos casos de raiva humana, e o cão era o principal transmissor da raiva aos humanos, no entanto a campanha de vacinação iniciada na

década de 80 diminuiu os casos da doença (Schneider et al., 1996). A incidência de raiva transmitida pelo morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) aumentou, e desde 2004 este quiróptero tornou-se o principal transmissor da raiva aos humanos (Secretaria..., 2006).

Estima-se que 40 mil cabeças de gado morram pela raiva transmitida por *D. rotundus* no Brasil, causando prejuízo direto em torno de 15 milhões de dólares anuais (Kotait, 1998). No Estado do Rio de Janeiro, não acontece caso de raiva humana, embora a doença seja enzoótica em bovinos (Romijn et al., 2003).

Recebido em 22 de fevereiro de 2008

Aceito em 11 de fevereiro de 2010

E-mail: lfpv@uenf.br

A caracterização genética e antigênica do vírus da raiva no Brasil segregava o vírus em, pelo menos, duas variantes: a variante do cão e a variante de *D. rotundus*. Essas variantes ainda podem ser filogeneticamente agrupadas por região geográfica de isolamento (Ito et al., 2003). Portanto, este trabalho propôs analisar, filogeneticamente, amostras isoladas de morcegos hematófagos, naturalmente infectados, capturados no Estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas nove capturas de morcegos hematófagos em cinco abrigos localizados em cidades dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, entre agosto de 2005 e setembro de 2006 (Tab. 1). Utilizando-se redes de neblina, armadas na saída de seus abrigos diurnos, foram capturados 199 morcegos. As capturas e a eutanásia foram autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis e pelo Comitê de Ética da UENF.

O encéfalo dos morcegos foi colhido e estocado a -20°C até a análise, e o diagnóstico foi realizado pela técnica de imunofluorescência direta (Dean et al., 1996) e pelo isolamento viral em células de neuroblastoma murino (N2A) (Webster e Casey, 1996). As amostras de cérebro positivas na imunofluorescência e no isolamento viral foram submetidas à transcrição reversa – reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). O RNA total foi extraído com Trizol Reagent (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A RT-PCR foi realizada como descrito por Orciari et al. (2001), com a substituição do *primer* 10g pelo 21g. Os pares de *primers* utilizados nas duas reações foram o 21g (senso, ATGTAACACCTCTACAATG, posição 55-73 do genoma viral) e o 304 (antissenso, TTGACGAAGATCTTGCTCAT, posição 1514-1533 do genoma viral).

Tabela 1. Descrição das capturas de *Desmodus rotundus* realizadas nos Estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES)

Captura		Local		Tipo de abrigo	N		
Nº	Data	Cidade/estado	Posicionamento geográfico		Macho	Fêmea	Total
1	25/08/05	Italva/RJ	S 21° 27' 06,4" W 041° 43' 34,2"	Natural	1	13	14
2	20/10/05	Bom Jesus do Norte/ES	S 21° 06' 45,8" W 041° 40' 55,6"	Artificial	13	18	31
3	29/10/05	Miracema/RJ	S 21° 23' 39,3" W 042° 04' 32,4"	Natural	26	21	47
4	14/03/06	Bom Jesus do Norte / ES	S 21° 06' 45,8" W 041° 40' 55,6"	Artificial	15	0	15
5	16/03/06	Campos dos Goytacazes/RJ	S 22° 00' 26,4" W 041° 40' 00,3"	Artificial	4	0	4
6	21/03/06	Quissamã/RJ	S 22° 05' 15,7" W 041° 41' 20,2"	Artificial	10	16	26
7	26/07/06	Quissamã/RJ	S 22° 05' 15,7" W 041° 41' 20,2"	Artificial	46	7	53
8	30/08/06	Quissamã / RJ	S 22° 05' 15,7" W 041° 41' 20,2"	Artificial	3	0	3
9	29/09/06	Bom Jesus do Norte/ES	S 21° 06' 45,8" W 041° 40' 55,6"	Artificial	5	1	6
Total					123	76	199

O produto da PCR foi purificado com o *kit* GFX (Amersham Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a reação de sequenciamento foi realizada com o *kit* BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e purificado com o *kit* Sephadex (Amersham Biosciences). Por último, as sequências foram determinadas pelo sequenciador automático (ABI Prism 3100 - Applied Biosystems). Duas

reações de sequenciamento foram realizadas para cada amostra, uma no sentido senso e outro no antissenso. Cada sequência foi revista no programa Chromas 2.24 (©1998-2004 Technelysium Pty Ltd), e a sequência completa foi obtida com o programa BioEdit 7.0.0 (©1997-2004 Tom Hall). As sequências produzidas nesse estudo foram publicadas no GenBank (Tab. 2).

Caracterização molecular do vírus...

As sequências de nucleotídeos produzidas foram alinhadas com as obtidas no GenBank (Tab. 3), usando o programa ClustalW, presente no BioEdit 7.0.0, e o alinhamento resultou em sequências de 1360 nucleotídeos. A árvore filogenética foi gerada utilizando-se o método de distância com o algoritmo *neighbor-joining* e modelo evolutivo *kimura-2*-parâmetros, com 1.000 repetições de *bootstrap*, por meio do programa Mega2 (Kumar et al., 2001).

Tabela 2. Identificação das sequências de vírus da raiva, isoladas de *D. rotundus* e publicadas no GenBank

Captura	Amostra	Nº de acesso GenBank
	0399	EF428576
	16-06	EF428577
7	24-06	EF428578
	25-06	EF428579
	26-06	EF428580
	27-06	EF428581
8	31-06	EF428582

Tabela 3. Sequências obtidas no GenBank organizadas por número de acesso no GenBank, local de isolamento (cidade e estado), espécie de isolamento e ano de isolamento do vírus

GenBank	Cidade	Estado	Espécie de Isolamento	Ano
M13215	-	-	-	-
D42112	-	-	-	-
AB083793	Goiânia	GO	Gato	1999
AB083794	Goiânia	GO	Gato	1999
AB083795	Goiânia	GO	Humano	1999
AB083796	Poços de Caldas	MG	Cão	1987
AB083797	Poços de Caldas	MG	Cão	1989
AB083798	Anápolis	GO	Cão	1999
AB083801	Goiânia	GO	Humano	1999
AB083804	Iporá	GO	Equino	1998
AB083805	São Roque	SP	Bovino	1994
AB083806	Taubaté	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	-
AB083807	Pindamonhangaba	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	1998
AB083808	Apiá	SP	Ovino	1992
AB083809	Nova Olinda	TO	Bovino	1998
AB083810	Araguanã	TO	Bovino	1999
AB083811	Colinas do Tocantins	TO	Bovino	1999
AB083813	Alto taquari	MT	Bovino	1999
AB083814	Cáceres	MT	Bovino	1999
AB083817	Pijurá	SP	Bovino	1989
AB083818	Corumbá	GO	Bovino	1999
AB117969	Itapira	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	1998
AB117970	São José do Rio Preto	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	1998
AB117971	Novo Horizonte	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	1998
AB117972	São José do Rio Preto	SP	<i>Artibeus planirostris</i>	1998
AB201802	Dracena	SP	<i>Artibeus lituratus</i>	2002
AB201803	Lindóia	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB201804	Lindóia	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	2000
AB201805	São José do Barreiro	SP	<i>Desmodus rotundus</i>	2001
AB201806	São José do Rio Preto	SP	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1999
AB201807	São José do Rio Preto	SP	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	1999
AB201808	Nova Granada	SP	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	2001
AB201809	Américo de Campos	SP	<i>Eumops auripendulus</i>	1998
AB201811	São José do Rio Preto	SP	<i>Eptesicus furinalis</i>	-
AB201814	Catanduva	SP	<i>Eptesicus furinalis</i>	2002
AB201815	Jales	SP	<i>Molossus molossus</i>	1999
AB201816	Ilha Solteira	SP	<i>Molossus molossus</i>	2002
AB201818	Itapira	SP	<i>Molossus abrasus</i>	2000
DQ640242*	Miracema	RJ	Bovino	2002
DQ640246*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003
DQ640247*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003
DQ640248*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003
DQ640249*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003
DQ640252*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003
DQ640254*	Porciúncula	RJ	Bovino	2003

*Amostras que não compuseram a árvore filogenética devido ao seu reduzido tamanho da sequência.

RESULTADOS

Sete dos 199 morcegos capturados foram positivos para a raiva pela imunofluorescência e isolamento viral em cultivo celular. Seis dos morcegos positivos foram capturados na captura 7 (0399, 16-06, 25-06, 26-06 e 27-06), o outro morcego foi apanhado na captura 8 (31-06). Todos os positivos foram capturados no mesmo abrigo, mas com diferença de um mês entre as duas capturas.

O sequenciamento parcial do gene da nucleoproteína das sete amostras de vírus da raiva resultou em sequências de 1360 nucleotídeos, as quais alinharam com a

sequência completa da cepa do vírus Pasteur (PV – M13215), do nucleotídeo 101 ao 1460. Todas as sete amostras foram idênticas, exceto pela 24-06 que apresentou uma substituição de nucleotídeo (G→A) na posição 1123.

A árvore filogenética (Fig. 1) foi dividida em cinco *clusters* principais, todos com valor de *bootstrap* de 100%. O *cluster* 1 compreendeu amostras relacionadas à raiva em *D. rotundus*; os *clusters* 2, 3 e 4 amostras relacionadas à raiva em morcegos insetívoros; e o *cluster* 5 relacionadas à raiva canina. Em uma análise detalhada do *cluster* 1, pode-se perceber a formação de seis *subclusters*.

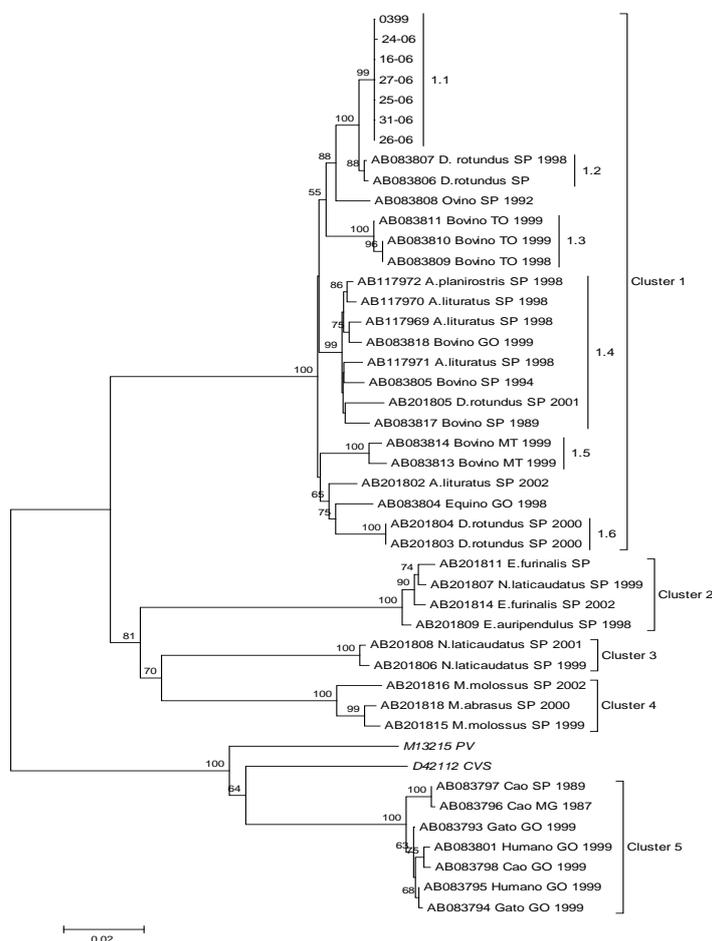


Figura 1. Árvore filogenética de distância para uma região de 1360 nucleotídeos do gene N do vírus da raiva. Amostras isoladas nesse trabalho estão no *subcluster* 1.1, amostras obtidas no *GenBank* estão identificadas pelo número de acesso, seguido da espécie de isolamento, estado e ano. Os valores de *bootstrap* acima de 50% são mostrados acima dos nós e a escala representa o número de substituição de nucleotídeos pelo número total no alinhamento.

DISCUSSÃO

Para a construção da árvore filogenética, além das sequências isoladas nesse estudo, foram utilizadas sequências de vírus da raiva provenientes de cães, animais de produção e morcegos frugívoros, insetívoros e hematófagos. Dentre as amostras isoladas de morcegos e animais de produção, as quais fazem parte do ciclo da raiva rural, foram selecionadas sequências dos Estados de Goiás, Mato Grosso, São Paulo e Tocantins.

Na árvore filogenética (Fig. 1), foi possível observar a segregação entre amostras de cães e morcegos. Também foi observada a formação de *subclusters* entre as amostras de vírus relacionadas a *D. rotundus*, de acordo com a região geográfica de isolamento, confirmando os resultados de diversos autores (Ito et al., 2001; Ito et al., 2003; Romijn et al., 2003; Sato et al., 2006).

O *cluster* 1 foi subdividido em seis *subclusters*. O *subcluster* 1.1 agrupou as amostras isoladas no presente trabalho, todas provenientes de morcegos hematófagos capturados no município de Quissamã, norte do Rio de Janeiro. As sequências isoladas nos demais Estados mostraram-se diferentes das amostras do Rio de Janeiro, agrupando-se nos outros *subclusters*.

As amostras isoladas em Quissamã também foram comparadas com oito sequências de vírus da raiva (uma de Miracema e sete de Porciúncula), isoladas de bovinos por Kimura (2006). As sequências alinhadas resultaram em fragmentos de 143 nucleotídeos. Devido ao seu reduzido tamanho, não entraram na árvore filogenética, contudo a matriz de identidade entre as amostras foi gerada. As amostras de Porciúncula mostraram 100% de identidade com as isoladas do presente trabalho em Quissamã, e a sequência de Miracema apresentou a substituição de um nucleotídeo, o que resultou em identidade de 99,3%.

Em uma análise da raiva dos herbívoros no Estado do Rio de Janeiro, Romijn et al. (2003) observaram que amostras isoladas em uma mesma bacia hidrográfica tendem a formar *clusters* na árvore filogenética, indicando maior grau de identidade. No entanto, Quissamã está localizada em uma bacia hidrográfica diferente

da de Porciúncula e Miracema. Talvez o foco da raiva tenha se deslocado de Miracema e Porciúncula até Quissamã. Segundo Tadei et al. (1991), no Estado de São Paulo, o foco da raiva move-se a uma velocidade de 16 a 21km por mês, isto é, 200km por ano. As distâncias entre Quissamã e Porciúncula e entre Quissamã e Miracema são de 90 e 130km, respectivamente, então a raiva chegaria a Quissamã antes de um ano, contudo o lapso de tempo entre os dois surtos foi de três anos.

Kobayashi et al. (2006), em análise da epidemiologia da raiva em *D. rotundus*, mostraram outro padrão de formação de *clusters*. As amostras de vírus da raiva, isoladas de regiões circundadas por grandes montanhas, são geneticamente mais próximas. Esse modelo é similar ao que foi encontrado entre as amostras de Quissamã, Porciúncula e Miracema, pois essas cidades ficam em uma faixa de altitude entre 0 e 200m.

Para estimar a confiança das análises com 143 nucleotídeos, as sequências utilizadas na árvore filogenética (Fig. 1) foram cortadas na porção 3' a fim de produzir fragmentos de 1350, 850, 650, 450, 250 e 140 nucleotídeos. Para cada tamanho foi construída uma árvore filogenética. Em todos os tamanhos de sequência, as árvores formaram os cinco *clusters* principais. As árvores construídas com os fragmentos de 1350 até 450 nucleotídeos formaram exatamente os mesmos *clusters* e *subclusters*. O *subcluster* 1.4 foi desorganizado na árvore construída com 250 nucleotídeos, e maiores alterações foram observadas na árvore de 140 nucleotídeos, sobretudo quanto à redução dos valores do *bootstrap*. Mesmo com o corte até 140 nucleotídeos, o *subcluster* 1.1, que agrupa as amostras isoladas no presente trabalho, foi mantido separado, com valor de *bootstrap* de 64%.

Informações são perdidas com fragmentos menores, mas ainda podem ser utilizadas na construção da árvore filogenética, como também foi descrito por Kissi et al. (1995) e Ito et al. (2003). No entanto, alguns laboratórios amplificaram a porção inicial da nucleoproteína, e outros a porção final e, dessa forma, não é possível alinhar as sequências para análise. Portanto, é importante a amplificação do maior fragmento do gene, sempre que possível.

Sugere-se existir, no Brasil, quatro variantes espécies-específica, isoladas de morcegos: uma de morcego hematófago *D. rotundus* e três de morcegos insetívoros *Eptesicus furinalis*, *Molossus* spp. e *Nyctinomops laticaudatus* (Kobayashi et al., 2005). Por outro lado, isolados virais de *Artibeus* spp., que são morcegos frugívoros, possuem alto grau de identidade de nucleotídeos com os vírus isolados de *D. rotundus*, o que sugere que pertencem ao mesmo ciclo epidemiológico (Shoji et al., 2004).

Nas capturas realizadas, foram encontrados, convivendo com *D. rotundus*, morcegos não hematófagos, principalmente o morcego frugívoro *Carollia perscipilata*. Portanto, para compor a árvore, foram selecionadas amostras de vírus isoladas de morcegos frugívoros e insetívoros, para se comparar com as de *D. rotundus*. As sequências produzidas no presente trabalho comportaram-se da mesma forma que a descrita pelos autores citados, ou seja, as sequências de vírus isoladas de *D. rotundus* e morcegos frugívoros (*Artibeus* spp.) agruparam-se no mesmo *cluster*, enquanto as amostras de morcegos insetívoros formaram *clusters* separados.

CONCLUSÃO

O vírus da raiva, que circula no ciclo epidemiológico de *D. rotundus* no Estado do Rio de Janeiro, possui característica filogenética que o diferencia de isolados dos demais Estados brasileiros. O sequenciamento de amostras de todos os Estados brasileiros seria de grande auxílio para a vigilância epidemiológica da raiva no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, ao Instituto Pasteur de São Paulo, ao Centro de Controle de Zoonoses de Campos dos Goytacazes e ao Núcleo de Defesa Sanitária de Bom Jesus do Itabapoana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p.88-95.
- ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 4. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>>. Acessado em: 18 jan. 2008.
- ITO, M.; ARAI, Y.T.; ITOU, T. et al., Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*, v.284, p.214-222, 2001.
- ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y. et al. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Virol.*, v.26, p.317-330, 2003.
- KIMURA, L.M.S. *Epidemiologia molecular de vírus da raiva em mamíferos domésticos e silvestres do Brasil*. 2006. 80f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.
- KISSI, B.; TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, v.209, p.526-537, 1995.
- KOBAYASHI, Y.; OGAWA, A.; SATO, G. et al. Geographical distribution of vampire bat-related cattle rabies in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, p.1097-1100, 2006.
- KOBAYASHI, Y.; SATO, G.; SHOJI, Y. et al. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, v.66, p.647-652, 2005.
- KOTAIT, I.; GONÇALVES, C.A.; PERES, N.F. *Controle da raiva dos herbívoros*. São Paulo: Instituto Pasteur,, 1998. 15p. (Manual técnico 1)
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B. et al. Mega2: molecular evolutionary analysis software. *Bioinformatics*, v.17, p.1244-1245, 2001.

Caracterização molecular do vírus...

- ORCIARI, L.A.; NIEZGODA, M.; HANLON, C.A. et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine*, v.19, p.4511-4518, 2001.
- ROMIJN, P.C.; HEIDE, R.V.D.; CATTANEO, C.A.M. et al. Study of lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.69, p.81-86, 2003.
- SATO, G.; KOBAYASHI, Y.; SHOJI, Y. et al. Molecular epidemiology of rabies from Maranhão and surrounding states in the northeastern region of Brazil. *Arch. Virol.*, v.151, p.2243-2251, 2006.
- SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, G.A.; SOUZA, L.M. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Rev. Saúde Públ.*, v.30, p.193-203, 1996.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Casos de Raiva Humana por Espécie Agressora, Brasil, 1986-2006. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/cvas/documentos/S%20E9rie%20Hist%20F3rica%20-%20Raivahumanaporagressora1986a2006.pdf>>. Acessado em: 5 jan. 2006.
- SHOJI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SATO, G. ET al. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.*, v.66, p.1271-1273, 2004.
- TADEI, V.A.; GONÇALVES, C.A.; PEDRO, W.A. ET al. Distribuição do morcego vampiro *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae) no estado de São Paulo e a raiva dos animais domésticos. Brasil, Campinas: CATI, 1991. 170p. (Impresso especial).
- WEBSTER, W.A.; CASEY, G.A. Virus isolation in neuroblastoma cell culture. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. (Eds). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p.96-104.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Expert Consultation on Rabies*. Geneva: WHO, 2004. 121p. (First report).