UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Mariana Perpétuo Dias

VALIDAÇÃO DE TESTE DE PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA DOS HERBÍVOROS E SEU PERFIL EPIDEMIOLÓGICO EM MINAS GERAIS

Belo Horizonte
2024

Mariana Perpétuo Dias

VALIDAÇÃO DE TESTE DE PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA DOS HERBÍVOROS E SEU PERFIL EPIDEMIOLÓGICO EM MINAS GERAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof ª. Drª. Erica Azevedo Costa

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Romero Nicolino

Belo Horizonte
2024

Dias, Mariana Perpétuo, 1990-
D541v Validação de teste de PCR em tempo real para diagnóstico da raiva dos herbívoros e seu perfil epidemiológico em Minas Gerais/ Mariana Perpétuo Dias.- 2024.
84 f: il.

Orientadora: Érica Azevedo Costa
Coorientador: Rafael Romero Nicolino
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.
Bibliografia f. 68 a 78
Apêndice: f. 79 a 84.

1. Herbívoro - Teses – 2. Raiva - Doença - Teses - I. Costa, Érica Azevedo- II. Nicolino, Rafael Romero III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 695 3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA PERPÉTUO DIAS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina Veterinária Preventiva**. Defesa da dissertação intitulada:

"VALIDAÇÃO DE TESTE DE PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA DOS HERBÍVOROS E SEU PERFIL EPIDEMIOLÓGICO EM MINAS GERAIS"

Aprovado(a) em 22 de agosto de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Erica Azevedo Costa - Orientador(a)
Dr.(a). Rafael Romero Nicolino
Dr.(a). Rodrigo de Souza Ferreira
Dr.(a). Tiago Facury Moreira

Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa**, **Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2024, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Tiago Facury Moreira**, **Professor do Magistério Superior**, em 23/08/2024, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Rafael Romero Nicolino**, **Professor do Magistério Superior**, em 26/08/2024, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo de Souza Ferreira**, **Usuário Externo**, em 28/08/2024, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3450058** e o código CRC **A104213D**.

Referência: Processo nº 23072.244415/2024-21 SEI nº 3450058

À memória do meu amado Nick, meu eterno amigo e inspiração. Sua lealdade e amor me ensinaram perseverança e compaixão. Agora, como uma estrela no céu, sua luz ilumina meu destino. Dedico esta conquista a você, com gratidão e carinho, por ter guiado e iluminado a direção do meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi um grande desafio, que não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas, às quais gostaria de expressar minha mais sincera gratidão.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que guiou meus passos durante toda essa jornada. Sua presença constante me deu forças nos momentos mais difíceis, concedendo-me sabedoria, serenidade e coragem para enfrentar cada desafio. Sem Sua graça e bênçãos, essa conquista não seria possível. A Ele, dedico não apenas essa vitória, mas todas as superações ao longo do caminho, pois foi Seu amor e proteção que me sustentaram e me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais, Nilza e Antônio, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, apoio e por acreditarem em mim em todos os momentos. Vocês são a base sólida que sustenta todas as minhas realizações. A presença constante e o suporte que sempre me ofereceram foram essenciais para que eu pudesse superar desafios e alcançar meus objetivos. Cada conquista é um reflexo do amor e da confiança que vocês me deram, e sem vocês, este momento não seria possível.

Ao meu marido, Adriano, por seu companheirismo, paciência e por estar ao meu lado em cada etapa desta caminhada. Sua parceria é um alicerce fundamental em minha vida, e sou imensamente grata por tudo o que compartilhamos. Você foi minha fortaleza nos momentos de dificuldade, sempre disposto a oferecer apoio e encorajamento quando eu mais precisei. Sem você, essa jornada teria sido muito mais árdua, e sua presença constante tornou cada desafio mais leve e cada vitória mais significativa. Sou profundamente grata por todo o amor, dedicação e apoio incondicional que me proporcionou.

Aos animais que trazem alegria à minha vida, especialmente aos meus filhos de penas e patas: Nick, Patchenko, Anastácia, Matias, Bento, Ozzy, Gertrudes e Alyssa. Nick e Bento, que agora estão no céu, foram verdadeiros anjos em minha vida. Nick foi mais do que um companheiro; ele foi a força que me guiou em um momento crucial, inspirando meu amor pelos animais e direcionando minha escolha profissional. Sua presença me ajudou a superar desafios e a encontrar propósito na medicina veterinária. Bento, com sua doçura e lealdade, também deixou uma marca profunda em meu coração. Cada um de vocês trouxe e continua trazendo imensa felicidade e conforto aos meus dias, tornando os momentos difíceis mais suportáveis e os felizes, ainda mais especiais.

Aos meus familiares, especialmente meus tios Matosinho e Xisto, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram; minha sogra, Maria da Penha, e meus cunhados e cunhadas, por todo o carinho e apoio; meus queridos sobrinhos, Vitor, Izabela, Gabriel, Davi e Liz, que preenchem meus dias com felicidade. O amor e a alegria que vocês me trazem tornam os desafios mais fáceis e as conquistas ainda mais valiosas.

Aos amigos que me motivaram e sempre estiveram ao meu lado, em especial Patrícia, Suellen, Daniela, Joana, Carol, Kênia, Dayane, Davidson, Felipe, Mariana Sacanni, Fabi, Fernanda Marchese, Amanda, Fernanda Lopes, Fernanda Santos, Karina, Tia Eni, Isabelle, Manuela, Letícia, Juliana Oliveira, Juliana Berteges, Juca, Thaís Caroline, Joelma, Janaína Campos, Ana Lívia, Victória, Maria Clara, Caio, Ketlen, Maria Paula, Dayanne Pires e Angélica, meu sincero agradecimento por suas palavras de apoio e encorajamento. Um agradecimento especial ao meu amigo Rafael Menezes, cujo apoio foi crucial para a escolha do mestrado e para minha trajetória acadêmica. Agradeço também à minha grande amiga Mariana Cardoso, cuja amizade tem sido relevante desde a graduação. Sua constante presença foi indispensável para enfrentar desafios e atingir minhas metas.

Um agradecimento especial à banda Hanson e aos Fansons, que se tornaram grandes amigos e têm sido parte da minha vida desde 1997. Ao longo dos anos, vocês trouxeram força, alegria e consolo em muitos momentos. A música de vocês sempre foi uma fonte de inspiração, ajudando-me a seguir em frente e a acreditar no poder dos sonhos. Graças a vocês, tive a oportunidade de vivenciar amizades inesquecíveis, viajar para lugares especiais e criar memórias que levarei comigo para sempre

Aos membros do LSA/IMA, que me acolheram desde 2019, quando iniciei meu estágio no laboratório. O suporte constante e a colaboração que recebi foram essenciais não apenas para a conclusão da minha graduação, mas também para o êxito no mestrado. Em especial, expresso minha sincera gratidão ao Guilherme Canhestro, Ronaldo Furtini, Safira Drumond, Cristiane Gomes, Evandro Reis, Leandro Augusto, Cláudia Ziviani, Marilda Martins e Danielle Bernardes. A dedicação e o apoio de cada um de vocês foram vitais para a realização desta pesquisa e para que eu pudesse enfrentar e superar os desafios que surgiram ao longo do percurso.

Aos meus amigos e companheiros do LPVA e de pós-graduação, com destaque especial para Thaís, Renata, Grazielle, Janaína, Ângela, Tamires, Bruna, Brenda, Nágila, Júlia, Larissa, Ailton e Otávia. Vocês foram extremamente importantes para que eu alcançasse meus objetivos, e cada um de vocês ocupa um lugar especial em meu coração. A jornada foi repleta de desafios, mas a parceria e a amizade de vocês tornaram cada passo mais leve e cada conquista ainda mais gratificante. Sou imensamente grata por todo o apoio, as risadas e as experiências que compartilhamos; às professoras do LPVA, Prof ª. Drª. Zélia Lobato e Prof ª. Drª. Maria Isabel Coelho Maldonado Guedes, pelo apoio durante este período. As contribuições de ambas foram vitais ao meu conhecimento.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Ferreira, Prof. Dr. Tiago Facury, Prof ª. Dr ª. Fernanda Magalhães e Prof ª. Drª Maria Isabel Coelho Maldonado Guedes, expresso minha profunda gratidão por fazerem parte deste momento, que marca a culminação de todo o meu esforço e aprendizado nesta jornada

À minha orientadora, Prof ª. Drª Erica Azevedo Costa, gostaria de expressar meu mais sincero agradecimento. Com sua vasta experiência e olhar crítico apurado, ela foi uma influência primordial ao longo de todo este projeto. Sua habilidade em oferecer críticas construtivas e sua atenção minuciosa aos detalhes moldaram esta pesquisa de maneira decisiva. Além disso, a Drª. Erica compartilhou generosamente seus conhecimentos e me ajudou a superar os desafios que surgiram ao longo do trajeto, guiando-me com paciência e firmeza. Sua dedicação foi inestimável, contribuindo significativamente para o meu crescimento acadêmico e profissional, e enriquecendo este trabalho com sua orientação cuidadosa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Romero Nicolino, cujo apoio incondicional e orientação foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. Ele fortaleceu minha confiança e capacidade de conduzir esta pesquisa com sucesso, contribuindo com valiosos conhecimentos ao longo do processo.

E, finalmente, uma menção especial ao Dr. Rodolfo Maximiano, meu professor de física, que me inspirou, apoiou e acreditou em mim desde os tempos em que eu me dedicava ao estudo de astronomia. Seu apoio foi crucial para minha formação e continua a influenciar minha trajetória até hoje.

Por fim, a todos que contribuíram de maneira significativa para o meu caminho, reconheço o impacto profundo e duradouro que tiveram na direção da minha vida. Sem o apoio e a inspiração de cada um de vocês, essa conquista não teria sido possível.

RESUMO

A raiva é uma zoonose viral de alta letalidade, causada pelo *Lyssavirus rabies* (RABV), pertencente ao gênero *Lyssavirus*. Como uma doença neurotrópica, o RABV demonstra afinidade pelo sistema nervoso central (SNC), o que resulta em encefalomielite progressiva e fatal, podendo afetar todos os mamíferos, incluindo seres humanos. Dada a letalidade de quase 100%, diagnosticar a raiva com rapidez e precisão é crucial para o controle e prevenção. A Imunofluorescência Direta (IFD) é o teste padrão-ouro para o diagnóstico, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) devido à sua alta sensibilidade e especificidade. No entanto, fatores como a qualidade das amostras, a preservação adequada, a habilidade técnica necessária para a leitura das lâminas e a presença de baixa carga viral pode afetar os resultados, o que destaca a necessidade de métodos diagnósticos complementares. O teste de Inoculação em Camundongos (IC) é amplamente adotado como método confirmatório à IFD na maioria dos laboratórios brasileiros. Embora eficaz, o IC apresenta limitações éticas e operacionais, como o uso de animais e o tempo prolongado necessário para a obtenção dos resultados. Em resposta a essas limitações, a OMS recentemente recomendou o ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* como uma alternativa moderna e eficiente para confirmação do diagnóstico da raiva. Este ensaio se destaca pela sua alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, sendo capaz de detectar de modo universal todos os *Lyssavirus*, mesmo em amostras com carga viral reduzida e em condições avançadas de autólise. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo validar e comparar o desempenho do ensaio LN34 em relação ao teste de IFD em amostras de SNC de herbívoros com suspeita de raiva, encaminhadas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para diagnóstico da doença no estado de Minas Gerais. Adicionalmente, verificar se o ensaio LN34 possui as qualidades necessárias como prova comprobatória à IFD. A pesquisa analisou 149 amostras de SNC, das quais 55 resultaram positivas no teste de IFD e 94 negativas. No ensaio de RT-qPCR LN34, 64 amostras apresentaram resultado positivo, 74 foram negativas e 11 foram inconclusivas. Os resultados indicaram que o ensaio LN34 apresentou sensibilidade de 96,36% e especificidade de 78,70%. A baixa especificidade foi atribuída às condições inadequadas de armazenamento das amostras, resultando em um aumento na quantidade de resultados discordantes entre os testes. Ademais, devido à alta sensibilidade do LN34, algumas amostras identificadas como positivas por este método foram negativas na IFD. Essas amostras apresentaram uma carga viral baixa, potencialmente não detectada pelo método de referência, mas identificada pelo ensaio LN34, resultando na classificação de amostras negativas na IFD como positivas no LN34. Conclui-se que o LN34 tem potencial como teste confirmatório à IFD,

mas a precisão dos resultados depende do armazenamento adequado e da realização rápida do teste após a coleta.

Palavras-chave: *Lyssavirus rabies*; raiva; Imunofluorescência Direta; RT-qPCR; LN34 Pan-*Lyssavirus*.

ABSTRACT

Rabies is a highly lethal viral zoonosis caused by the *Lyssavirus rabies* (RABV), belonging to the genus *Lyssavirus*. As a neurotropic disease, RABV demonstrates affinity for the central nervous system (CNS), leading to progressive and fatal encephalomyelitis, affecting all mammals, including humans. Given its nearly 100% lethality, rapid and accurate rabies diagnosis is crucial for its control and prevention. Direct Immunofluorescence (DIF) is the gold standard test for diagnosis, recommended by the World Health Organization (WHO) due to its high sensitivity and specificity. However, factors such as sample quality, proper preservation, the technical expertise required for slide reading, and low viral load can affect the results, highlighting the need for complementary diagnostic methods. The Mouse Inoculation Test (MIT) is widely used as a confirmatory method for DIF in most Brazilian laboratories. Despite its efficacy, MIT has ethical and operational limitations, such as the use of animals and the prolonged time required for results. To address these limitations, the WHO recently recommended the LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay as a modern and efficient alternative for rabies confirmation. This assay stands out for its high sensitivity and specificity, enabling universal detection of all *Lyssavirus* species, even in samples with low viral loads and advanced autolysis conditions. This study aimed to validate and compare the performance of the LN34 assay with DIF in CNS samples from herbivores suspected of rabies, submitted to the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) for rabies diagnosis in the state of Minas Gerais, Brazil. Additionally, it sought to determine whether the LN34 assay possesses the necessary qualities to serve as a confirmatory test for DIF. The research analyzed 149 CNS samples, of which 55 tested positive and 94 negative using DIF. In the LN34 RT-qPCR assay, 64 samples were positive, 74 negative, and 11 inconclusive. The results showed that the LN34 assay had a sensitivity of 96.36% and a specificity of 78.70%. The low specificity was attributed to inadequate sample storage conditions, leading to an increase in discordant results between the tests. Furthermore, due to LN34's high sensitivity, some samples identified as positive by this method were negative in DIF. These samples had a low viral load, potentially undetectable by the reference method but identified by the LN34 assay, resulting in the classification of DIF-negative samples as positive in LN34. It is concluded that LN34 has potential as a confirmatory test for DIF, but result accuracy depends on proper storage and prompt testing after sample collection.

Keywords: *Lyssavirus rabies*; rabies; Direct Immunofluorescence; RT-qPCR; LN34 Pan-*Lyssavirus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – *Estrutura do Lyssavirus rabies (RABV).* 27
Figura 2 - Estrutura do genoma do RABV. 27
Figura 3 – Cadeia epidemiológica de transmissão da raiva. 30
Figura 4 – Morcego hematófago (morcego vampiro) da espécie *Desmodus rotundus.* 32
Figura 5 – Lâmina de Imunofluorescência Direta positiva para o diagnóstico de raiva. 40
Figura 6 - Lâmina de Imunofluorescência Direta negativa para o diagnóstico de raiva. 40
Figura 7 - Distribuição geográfica do número de amostras enviadas para diagnóstico da raiva pelos municípios de Minas Gerais entre março e dezembro de 2023. 58
Figura 8 - Distribuição geográfica das amostras positivas para raiva diagnosticadas por IFD nos municípios de Minas Gerais, de março a dezembro de 2023. 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação das espécies de *Lyssavirus* de acordo com o grupo filogenético.....22
Quadro 2 - Variantes antigênicas identificadas no Brasil por espécie animal acometida.....24
Quadro 3- Sequências dos *primers* e da sonda degenerados usados no ensaio universal Pan-*Lyssavirus* LN34, aplicados na técnica de *One-Step* RT-qPCR.....48
Quadro 4 - Preparação da mistura da reação (*Mix*) LN34 para o RT-qPCR.....49
Quadro 5 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da PCR em tempo real para o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus e* β-actina. 49
Quadro 6 - Sequências de *primers* e sonda de hidrólise utilizadas na técnica de RT-qPCR para a detecção do gene endógeno da β-actina.....50
Quadro 7- Preparação da mistura da reação (*Mix*) β-actina para o RT-qPCR. 51
Quadro 8 - Classificação do Ct (*Threshold Cycle*) das amostras analisadas pelo ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus One-Step* RT-qPCR.....52
Quadro 9 - Amostras que apresentaram resultados divergentes entre os ensaios realizados, sendo negativas na IFD, mas positivas no RT-qPCR Pan-*Lyssavirus*. 55
Quadro 10 - Amostras que apresentaram resultados inconclusivos no RT-qPCR LN34, divergindo dos resultados do teste padrão-ouro. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação do coeficiente *Kappa*.....54
Tabela 2 - Tabela de contingência para avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica entre a Imunofluorescência Direta (IFD) e o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para detecção RABV em 149 amostras de Sistema Nervoso Central. 55
Tabela 3 - Tabela de contingência 2 x 2, utilizada para calcular o índice *Kappa* de concordância e avaliar a concordância entre os dois métodos diagnósticos utilizados.....57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das amostras por espécie em Minas Gerais durante o período de março a dezembro de 2023 obtidas através da IFD: totais de amostras positivas e negativas. 60

Gráfico 2 - Número de amostras de SNC recebidas e respectivos resultados (positivos, negativos e inconclusivos) para raiva, por espécie, utilizando o método RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus.* 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 História da raiva 18
2.2 Taxonomia do vírus 20
2.3 Variação antigênica 23
2.4 Agente etiológico 24
2.5 Proteínas virais 25
2.6 Conformação estrutural do vírus 26
2.7 Transmissão 28
2.8 Cadeia epidemiológica de transmissão 29
2.9 Aspectos clínicos 34
2.9.1 Raiva furiosa 35
2.9.2 Raiva paralítica 36
2.10 A raiva em herbívoros 36
2.11 Diagnóstico da raiva animal 38
2.11.1 Imunofluorescência Direta (IFD) 39
2.11.2 Inoculação em Camundongo 41
2.11.3 Aplicação de métodos moleculares no diagnóstico da raiva 42
3 OBJETIVOS 45
3.1 Objetivo geral 45
3.2 Objetivos específicos 45
4 MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1 Amostragem 45
4.2 Procedimentos diagnósticos realizados pelo LSA/IMA 46
4.2.1 Imunofluorescência Direta 46
4.2.2 Inoculação em Camundongo 46
4.2.3 Encaminhamento de amostras para diagnóstico molecular 47
4.3 Processamento das amostras 47
4.4 Extração de RNA total utilizando kit de extração *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* 48
4.5 *Primers* e sonda RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus One-step* 48
4.6 Adaptação de protocolo para RT-qPCR Pan-*Lyssavirus* utilizando *Kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step* RT-qPCR 48
4.7 *Primers* e sonda utilizados para controle endógeno de β-actina 49
4.8 Adaptação de protocolo para RT-qPCR para o controle do gene da β-actina 50

4.9 Procedimentos para realização do RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e β-actina.....51
4.10 Interpretação de resultados.....52
4.11 Georreferenciamento do diagnóstico da raiva em MG.....52
4.12 Análises estatísticas.....53
4.13 Sensibilidade e especificidade diagnóstica.....53
4.13.1 Sensibilidade diagnóstica.....53
4.13.2 Especificidade diagnóstica.....53
4.14 Índice de concordância.....54
5 RESULTADOS.....54
5.1 Análise de sensibilidade e especificidade diagnóstica.....54
5.2 Nível de concordância.....56
5.3 Análise descritiva.....57
5.3.1 Distribuição espacial das amostras de herbívoros submetidas para diagnóstico da raiva em Minas Gerais.....57
5.3.2 Distribuição espacial das amostras positivas na IFD.....58
5.3.3 Classificação das amostras de acordo com a espécie.....59
5.3.4 Comparação das taxas de positividade entre RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e IFD.....61
6 DISCUSSÃO.....61
6.1 Comparação do desempenho dos métodos diagnósticos RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e IFD na detecção do RABV.....61
6.2 Distribuição espacial das amostras submetidas para diagnóstico.....64
6.3 Distribuição regional dos casos positivos.....65
6.4 Disparidade no envio e positividade das amostras por espécie.....66
7 CONCLUSÃO.....67
REFERÊNCIAS.....68
APÊNDICE A - Resultados individuais das amostras submetidas à: Imunofluorescência Direta, Isolamento Viral em Camundongo e RT-PCR LN34 Pan-*Lyssavirus* (LN34 e β-actina).....79

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade viral infectocontagiosa com potencial zoonótico, que afeta o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, incluindo os seres humanos (MBILO *et al*., 2021). Notória por sua alta letalidade, próxima de 100% após o aparecimento dos sinais clínicos neurológicos, a prevenção e o diagnóstico precoce são extremamente importantes (GIGANTE *et al*., 2018; HAMPSON *et al*., 2015; HEMACHUDHA *et al*., 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) consideram a raiva um grande problema de saúde pública, impactando majoritariamente comunidades carentes e vulneráveis. Globalmente, essa condição continua a ceifar cerca de 60 mil vidas humanas por ano, destacando a urgente necessidade de medidas eficazes de controle e prevenção (HAMPSON *et al*., 2015; WHO, 2024; OPAS, 2023).

O agente etiológico da raiva é um vírus envelopado da espécie *Lyssavirus rabies* (RABV), pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*. Seu genoma é constituído por ácido ribonucleico (RNA), com fita simples e polaridade negativa (GIGANTE *et al*., 2018).

A disseminação do RABV ocorre predominantemente pela inoculação do vírus presente na saliva de animais infectados, através de mordedura, arranhadura ou lambedura. A manifestação da doença é caracterizada por encefalomielite aguda progressiva, que resulta em sintomas neurológicos graves levando ao óbito (SOUSA *et al*., 2013).

No Brasil, a raiva é considerada endêmica, apresentando uma distribuição epidemiológica heterogênea que varia conforme a região geopolítica (FERREIRA, 2007). Devido às dimensões continentais e à diversidade da fauna, o país enfrenta um desafio significativo no controle do vírus, principalmente devido à variedade de espécies reservatório e à capacidade do vírus de se adaptar a novos hospedeiros dentro de uma mesma área geográfica.

Nos últimos anos, Minas Gerais (MG) emergiu como um dos estados com aumento significativo nos casos de raiva, tanto em humanos quanto em animais. Dados zoossanitários coletados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) indicam que não havia notificações de casos de raiva urbana em cães e gatos desde 2012. No entanto, entre 2019 e 2022, foram identificados oito casos do vírus em pequenos animais. O último caso de raiva humana no estado havia sido documentado em junho de 2012, na cidade de Rio Casca. Contudo, em 2022, após uma década, ocorreu um surto de raiva humana no município de Bertópolis, que afetou uma tribo indígena e resultou na morte de quatro pessoas. Além disso, em abril de 2023, registrou-se um caso de raiva humana na cidade de Mantena, que acometeu um produtor de bovinos, destacando, assim, a persistência do vírus na região.

Em relação à circulação do vírus entre animais de produção, em 2023, o MAPA registrou 522 casos de raiva em herbívoros no Brasil. Esses casos concentraram-se principalmente nos estados da região Sudeste, com 187 casos (35,8%), e Sul, com 179 casos (34,3%). Entre esses registros, destacam-se 81 casos (15,5%) no Paraná (PR), seguidos por 72 casos (13,79%) em Minas Gerais e 62 (11,8%) no Rio Grande do Sul (RS). Esses dados evidenciam Minas Gerais como o segundo estado com maior ocorrência de raiva em herbívoros no país, destacando a necessidade de abordar de forma eficaz essa problemática na região.

Devido à letalidade da raiva, os métodos de diagnóstico desempenham um papel crucial na confirmação da doença em casos suspeitos. É fundamental que sejam rápidos, precisos e acessíveis para permitir a implementação de medidas de controle e prevenção adequadas e prevenir a doença em indivíduos expostos (GIGANTE *et al*., 2018).

Embora existam várias abordagens para diagnosticar a raiva, poucas atendem plenamente aos critérios desejados. Mesmo as técnicas mais comuns apresentam limitações inerentes, como ocorre em qualquer método diagnóstico. Portanto, a combinação de diferentes técnicas é buscada para aprimorar a precisão diagnóstica (GERMANO *et al*., 1977).

A técnica padrão-ouro para o diagnóstico da raiva *post mortem*, recomendada pela OMS e pela OIE/OMSA, é a Imunofluorescência Direta (IFD). A IFD é altamente sensível e específica, permitindo a identificação rápida do antígeno viral em amostras de tecido encefálico (WHO, 2018; OIE, 2018). No entanto, a precisão dessa técnica pode ser afetada por diversos fatores, como o estado avançado de autólise das amostras, baixa carga viral e qualidade dos insumos. Além disso, a experiência do profissional na leitura das lâminas é fundamental para garantir a acurácia dos resultados (GIGANTE *et al*., 2018).

Como método confirmatório à IFD no diagnóstico da raiva, é utilizada a prova biológica, conhecida como Inoculação em Camundongo (IC). Essa técnica consiste na inoculação intracerebral do tecido nervoso do animal suspeito de raiva em camundongos, que são sensíveis ao vírus. Após um período de observação, os camundongos são examinados para detectar a presença do RABV no SNC. É um ensaio capaz de identificar o RABV em amostras com uma quantidade reduzida de vírus, mas apesar de ser um método eficaz na confirmação da doença, apresenta algumas desvantagens significativas (MESLIN; KAPLAN, 1996). Primeiramente, é um procedimento demorado, pois os camundongos precisam ser observados por um período considerável para que a infecção pelo vírus se desenvolva. Além disso, há questões éticas relacionadas ao uso de animais em experimentação (MORAES, 2023).

Diante desses desafios, novas técnicas, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), têm sido avaliadas como métodos complementares à IFD. Esses

avanços no diagnóstico molecular oferecem a possibilidade de detecção mais ampla do RABV, com alta especificidade e sensibilidade. Recentemente, a OMS recomendou um novo ensaio de RT-qPCR como uma alternativa eficaz para confirmar a presença da raiva. Denominado LN34 Pan-*Lyssavirus*, este teste possui a capacidade de detectar, de maneira abrangente, todas as espécies que pertencem ao gênero *Lyssavirus*. Além disso, destaca-se por sua alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, oferecendo maior precisão na identificação, mesmo em amostras com baixa carga viral e em condições avançadas de autólise (GIGANTE *et al*., 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019; WADHWA *et al*., 2017).

Em vista dessas inovações, este estudo tem como objetivo validar, explorar e comparar métodos diagnósticos para o vírus da raiva, com ênfase na técnica padrão-ouro e no ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*. Além disso, busca verificar se o ensaio LN34 possui as qualidades necessárias para ser uma técnica confirmatória adicional à IFD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da raiva

A raiva é conhecida como uma das afecções mais antigas e temidas pela humanidade, com uma história que remonta a pelo menos quatro milênios sendo que, nesta época, se referiam a ela como uma doença que acometia homens e cães, tornando-os "loucos" (TARANTOLA, 2017).

O termo "raiva" tem origem no latim *rabere*, que significa "fúria" ou "loucura". No entanto, também encontramos raízes no sânscrito, antigo idioma indiano, onde era denominada como *rabhas*, que significa "tornar-se violento". Já na Grécia antiga, a raiva era conhecida como *Lyssa* ou *Litta*, termos que se referiam à "loucura" ou "demência". Sendo que essas nomenclaturas refletiam diretamente à natureza violenta e aos sintomas severos correlacionados à enfermidade (KOTAIT *et al*., 2009).

Relatos históricos indicam que a doença foi observada na região do Egito por volta de 2300 a.C. (antes de Cristo) e se dispersou através das civilizações que habitavam às margens dos rios Nilo, Eufrates e Indo, que atribuíam a sua origem como uma punição divina ou uma manifestação de forças sobrenaturais (FENNER, 1992 apud MACIEL, 2000). Documentos da Mesopotâmia mencionavam a raiva como uma doença mortal transmitida por mordidas de animais, sendo que, o primeiro registro escrito de mortes causadas pela raiva em cães e humanos encontra-se no Código de *Eshnunna* da Babilônia, datado de 1930 a.C. que delineava as leis da época, incluindo a obrigação do proprietário pagar uma multa monetária ao Estado caso seu cão transmitisse a raiva a outra pessoa (TARANTOLA, 2017; YUHONG, 2001).

No século V a.C., Demócrito descreveu com exatidão os sintomas comportamentais associados à raiva em cães. Ele observou a agressividade e a fúria dos animais raivosos, notando que a doença parecia afetar o cérebro e o comportamento dos animais, levando-os a atacar e morder indiscriminadamente (BAER, 2007).

A doença também foi relatada por Aristóteles, o renomado filósofo grego do século IV a.C., em sua obra "História dos Animais". Aristóteles descreveu que os cães afetados pela raiva desenvolviam uma intensa agressividade e um medo extremo da água. Esse medo da água era um indicativo importante para a identificação da doença naquela época (BAER, 2007).

Cornelius Celsus, um enciclopedista romano do século I d.C. (depois de Cristo), destacou em sua obra "De Medicina" a importância da saliva dos animais na transmissão da raiva. Ele reconheceu que não apenas os cães, mas também outros animais poderiam ser vetores da doença. Celsus foi um dos primeiros a enfatizar a natureza contagiosa da saliva dos animais infectados, contribuindo para o conhecimento médico da antiguidade (TARANTOLA, 2017).

A raiva transmitida por animais silvestres foi descrita pela primeira vez na Europa no século IX d.C. Em *Lyon*, França, um urso raivoso emergiu de um bosque próximo ao porto e atacou vinte remadores que tentaram matá-lo a pauladas. Como resultado das mordeduras, seis remadores desenvolveram a doença e morreram devido às mordidas do animal infectado (BRAVO, 1978).

No continente americano, a primeira menção à raiva ocorreu no século XVI d.C. realizada pelo capitão Fernández de Oviedo durante a colonização espanhola da península mexicana de *Yucatán*. O capitão espanhol identificou a raiva como causa de mortes de diversos soldados, após sofrerem mordidas de morcegos (BAER, 2007).

No início do século XIX d.C., em 1804, o cientista alemão Georg Gottfried Zinke demonstrou que a raiva podia ser transmitida pela saliva de cães infectados (ZINKE, 1804). Em 1869, Trousseau detalhou os sintomas da raiva e propôs a hipótese de que a doença era causada por um vírus específico, transmitido exclusivamente através das mordidas de animais infectados (ATANASIU, 1974 apud MACIEL, 2000). Uma década depois, em 1879, Duboué observou que o vírus da raiva se propaga pelos nervos periféricos após a mordedura de um animal infectado, até atingir o SNC. No mesmo ano, Galtier adaptou a doença ao coelho por meio de experimentos, criando um modelo que seria utilizado pelo cientista francês Louis Pasteur e seus colaboradores para estudar a raiva (ATANASIU, 1974 apud MACIEL, 2000).

Os estudos de Louis Pasteur sobre a raiva começaram em 1880. Em 1885, após cinco anos de pesquisas, ele e sua equipe conseguiram isolar o vírus. Depois de várias passagens do vírus em coelhos, obtiveram uma cepa estável com um período de incubação de cerca de sete

dias, fenômeno denominado "vírus fixo". Além disso, Pasteur e seus colaboradores demonstraram que o SNC era o principal local de replicação viral. Ainda em 1885, desenvolveram a primeira vacina antirrábica e a aplicaram pela primeira vez em um ser humano. Esta descoberta representou um marco na história da microbiologia aplicada à medicina (ATANASIU, 1974 apud MACIEL, 2000).

No início do século XX, em 1903, o cientista Adelchi Negri descreveu a presença de inclusões eosinofílicas intracitoplasmáticas nos neurônios do hipocampo de animais infectados. Essas estruturas foram posteriormente denominadas “corpúsculos de Negri” (ATANASIU, 1974 apud MACIEL 2000).

Por volta de 1911, a raiva foi descrita pela primeira vez no Brasil pelo médico Carini. Após um surto da doença em herbívoros em Santa Catarina, Carini desempenhou um papel crucial ao realizar o diagnóstico através da demonstração dos corpúsculos de Negri nos neurônios e ao reproduzir experimentalmente a doença. A partir de seus estudos, surgiu a hipótese de que a raiva poderia ser transmitida por morcegos hematófagos. Essa descoberta representou um marco na compreensão e no controle da raiva no Brasil (CARINI, 1911).

No entanto, apesar de sua longa história e descrição desde os tempos antigos, a raiva continua a assombrar o mundo contemporâneo, em grande parte devido à negligência dos poderes responsáveis. De acordo com dados divulgados pela OPAS/OMS, atualmente essa doença ceifa cerca de 60 mil vidas humanas por ano globalmente, com maior impacto em populações vulneráveis de áreas remotas e rurais. A escassez de recursos para diagnóstico e a falta de conhecimento especializado dificultam a implementação de medidas eficazes de prevenção e controle. Em consequência, a raiva ainda persiste como um desafio significativo para a saúde pública nessas regiões (OMS, 2023; WADHWA *et al*., 2017).

2.2 Taxonomia do vírus

A classificação taxonômica do RABV, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), classifica o vírus da raiva como pertencente ao super-reino *Viruses*, domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, subfamília *Alpharhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* e espécie *Lyssavirus rabies*.

No entanto, apesar do RABV ser a espécie associado à raiva clássica, são reconhecidas 18 espécies, sendo 17 determinadas e 1 candidata, do gênero *Lyssavirus*, responsáveis por encefalites semelhantes à causada pelo RABV. Essas espécies são classificadas em pelo menos

três grupos filogenéticos que são imunopatologicamente distintos, como demonstrado no quadro 1 (ICTV, 2024).

- Filogrupo I: *Lyssavirus rabies* (Rabies virus, RABV), *Lyssavirus aravan* (Aravan virus, ARAV), *Lyssavirus australis* (Australian bat lyssavirus, ABLV), *Lyssavirus bokeloh* (Bokeloh bat lyssavirus, BBLV), *Lyssavirus duvenhage* (Duvenhage virus, DUVV), *Lyssavirus formosa* (Taiwan bat lyssavirus, TWBLV), *Lyssavirus gannoruwa* (Gannoruwa bat lyssavirus, GBLV), *Lyssavirus hamburg* (European bat lyssavirus 1, EBLV-1), *Lyssavirus helsinki* (European bat lyssavirus 2, EBLV-2), *Lyssavirus ikoma* (Ikoma lyssavirus, IKOV), *Lyssavirus irkut* (Irkut virus, IRKV), *Lyssavirus khujand* (Khujand virus, KHUV), *Lyssavirus kotalahti* (Kotalahti bat lyssavirus, KBLV).

- Filogrupo II: *Lyssavirus lagos* (Lagos bat virus, LBV), *Lyssavirus mokola* (Mokola virus, MOKV), *Lyssavirus shimoni* (Shimoni bat virus, SHIBV).

- Filogrupo III: *Lyssavirus lleida* (Lleida bat lyssavirus, LLEBV), *Lyssavirus ikoma* (Ikoma lyssavirus, IKOV), *Lyssavirus caucasicus* (West Caucasian bat virus, WCBV).

O vírus *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV), ainda não foi oficialmente classificado. No entanto, apresenta características semelhantes às do filogrupo I. Portanto, ele está temporariamente incluído nesse grupo genético (NOKIREKI *et al*., 2018; ICTV, 2022).

Quadro 1- Classificação das espécies de *Lyssavirus* de acordo com o grupo filogenético.

Filogrupo	Espécie	Vírus	Abreviatura	Distribuição
I	*Lyssavirus aravan*	Aravan vírus	ARAV	Ásia central
	Lyssavirus australis	Australian bat lyssavirus	ABLV	Austrália e sudeste da Ásia
	Lyssavirus bokeloh	Bokeloh bat lyssavirus	BBLV	Europa oriental
	Lyssavirus duvenhage	Duvenhage virus	DUVV	África subsaariana
	Lyssavirus hamburg	European bat lyssavirus 1	EBLV-1	Noroeste da Europa
	Lyssavirus helsinki	European bat lyssavirus 2	EBLV-2	Noroeste da Europa
	Lyssavirus gannoruwa	Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV	Ásia (Sri Lanka)
	Lyssavirus irkut	Irkut vírus	IRKV	Leste da Ásia
	Lyssavirus khujand	Khujand vírus	KHUV	Ásia Central
	*	Kotalahti bat lyssavirus*	KBLV	Europa (Finlândia)
	Lyssavirus rabies	Rabies virus	RABV	Mundial
	Lyssavirus formosa	Taiwan bat lyssavirus	TWBLV	Leste da Ásia
II	*Lyssavirus lagos*	Lagos bat virus	LBV	África subsaariana
	Lyssavirus mokola	Mokola virus	MOKV	África subsaariana
	Lyssavirus shimoni	Shimoni bat virus	SHIBV	África subsaariana
III	*Lyssavirus ikoma*	Ikoma lyssavirus	IKOV	África (Tanzânia)
	Lyssavirus lleida	Lleida bat lyssavirus	LLEBV	Europa ocidental
	Lyssavirus caucasicus	West Caucasian bat virus	WCBV	Sudeste da Europa e África (Quênia)

*Espécie candidata ao gênero *Lyssavirus* Fontes: ICTV, 2024.

A relevância das outras lissaviroses semelhantes à raiva ainda não são bem compreendidas, uma vez que a incidência de casos em humanos é rara. Parece que a disseminação das demais espécies de *Lyssavirus* é limitada a algumas regiões geográficas específicas. Contudo, em regiões consideradas livres da raiva canina, como a Europa Ocidental e a Austrália, foram recentemente reportados casos em humanos e em morcegos causados por outros *Lyssavirus* divergentes do RABV (CHIERATO, 2021; JOHNSON *et al*., 2010; WEIR *et al*., 2014).

2.3 Variação antigênica

No Brasil e na América Latina, a única espécie de *Lyssavirus* detectada foi a *Lyssavirus rabies* (RABV), que pode se expressar em 12 variantes antigênicas (AgV) conforme seus respectivos hospedeiros naturais, que foram estudadas através de isolados deste vírus por um painel estabelecido pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) e pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (KOTAIT *et al*., 2009).

Entretanto, em território brasileiro, foram identificadas 7 dessas AgV, cada uma associada a reservatórios específicos, sendo elas: AgV1, AgV2 isoladas de cães, AgV3, de morcego hematófago (*Desmodus rotundus*) e AgV4 e AgV6, isoladas de morcegos insetívoros (*Tadarida brasiliensis* e *Lasiurus cinereus*; respectivamente). Existem outras duas variantes encontradas na fauna brasileira: uma em *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) denominada AgV2*, que é provavelmente uma adaptação do vírus presente em cães domésticos à população de animais silvestres, e outra em *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco), AgVCN. No entanto, essas variantes não são compatíveis com o painel para estudos do vírus rábico nas Américas, porém possuem um perfil antigênico constante (quadro 2) (KOTAIT *et al*., 2009).

Essas variantes são fundamentais para compreender a epidemiologia da raiva e a diversidade de hospedeiros envolvidos na transmissão do vírus. O estudo dessas variantes permite uma melhor compreensão da dinâmica da doença e das interações entre diferentes espécies de hospedeiros, contribuindo para estratégias mais eficazes de controle e prevenção da raiva (BRASIL, 2016; KOTAIT *et al*., 2009).

Quadro 2 - Variantes antigênicas identificadas no Brasil por espécie animal acometida.

Espécie	Variações antigênicas	Hospedeiro
Lyssavirus rabies	AgV1	*Canis lupus familiaris* (Cão)
	AgV2	*Canis lupus familiaris (Cão)*
	AgV3	*Desmodus rotundus* (Morcego hematófago)
	AgV4	*Tadarida brasiliensis* (Morcego insetívoro)
	AgV6	*Lasiurus cinereus* (Morcego insetívoro)
	AgV2*	*Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato)
	AgVCN.	*Callithrix jacchus* (Sagui-de-tufo-branco)

Fonte: (BRASIL, 2016).

2.4 Agente etiológico

O RABV, agente etiológico responsável por desencadear a raiva, é um vírus envelopado, constituído por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), linear, não segmentado, senso negativo (WUNNER, 2020). Tem aproximadamente 11,9 a 12,3 *kilobases* (Kb) de comprimento e uma simetria cilíndrica, alongada e ligeiramente cônica em uma das extremidades, conferindo-lhe uma aparência similar à de uma bala de revólver ou a um projétil. Esta forma cilíndrica tem aproximadamente 100-430 nanômetros (nm) de comprimento e 45-100 nm de diâmetro (MACLACHLAN *et al*., 2017), e o genoma viral possui aproximadamente 12.000 nucleotídeos. É um vírus composto por diversas moléculas, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e RNA. As proteínas representam a maior parte da massa total do vírus, compondo entre 67% e 74%. Os lipídios formam uma parte significativa, correspondendo a 20% a 26% da massa total. Os carboidratos e o RNA constituem menores proporções, com os carboidratos representando cerca de 3% e o RNA entre 2% e 3% da massa total (FOOKS *et al*., 2020).

O genoma viral é composto por cinco genes, cada um responsável por codificar uma das cinco proteínas estruturais essenciais para o vírus, sendo que, os genes recebem os mesmos nomes das proteínas sintetizadas (WUNNER, 2007). Esses genes e proteínas desempenham papéis cruciais na replicação e infecção do vírus, sendo eles: nucleoproteína (N), fosfoproteína

(P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase RNA dependente, também conhecida como proteína *large* (L) (FAUQUET *et al*., 2005; FOOKS *et al*., 2020).

2.5 Proteínas virais

A proteína N é uma proteína fosforilada composta por 450 aminoácidos (aa), com uma massa molecular de cerca de 57 kilodalton (KDa). Esta proteína é o elemento predominante do RABV, é a mais preservada em termos de sequência de aminoácidos, mesmo entre as distintas espécies do gênero *Lyssavirus*. Embora exista uma certa variação genética em pequenas regiões do gene N, a sequência da proteína N permanece altamente preservada. Isso se deve ao seu papel essencial na encapsidação específica do RNA genômico, protegendo-o das ribonucleases (RNases) celulares e mantendo o RNA em uma configuração adequada para a transcrição. Essa proteína também tem a capacidade de induzir imunoglobulinas neutralizantes e apresenta epítopos significativos para o reconhecimento por linfócitos T (SOUZA, 2021; MARSTON *et al*., 2007; WUNNER, 2007). Além disso, é a proteína com maior conservação antigênica, contendo quatro sítios antigênicos (WUNNER *et al*., 2020; TORDO, 1996). Isso torna o gene N um alvo ideal para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico (SOUZA, 2021).

A proteína P, comparada com outras proteínas dos *Lyssavirus*, é a menos conservada. Composta por um polipeptídeo fosforilado de 297 aa, possui um peso molecular de 38 kDa. Estabelece interações com as proteínas N e L, sugerindo uma possível função de cofator para esta última. Também pode estar associada à disseminação e patogênese do vírus (MEBATSION, 2001; LAFON *et al.*, 1985).

A proteína M, a menor do vírus da raiva, com 25 kDa e 202 aminoácidos, desempenha um papel crucial na replicação e disseminação viral. Ela forma uma bainha ao redor da ribonucleoproteína (RNP), conferindo estabilidade ao vírion. Além de sua função estrutural, a proteína M interage com proteínas virais e membranas celulares do hospedeiro, facilitando a liberação do vírus e o brotamento através da membrana plasmática, assegurando a continuidade do ciclo infeccioso (WUNNER *et al*., 2020).

A proteína G, composta por 505 aminoácidos e pesando cerca de 65 kDa, é crucial para a ligação do vírus da raiva à célula hospedeira. Ao interagir com os receptores celulares, ela induz a endocitose e a fusão do vírus com a célula, facilitando a entrada viral e a liberação de novos vírions. Além disso, a proteína G desempenha um papel essencial na resposta imunológica, induzindo anticorpos neutralizantes e colaborando com as proteínas N e P na ativação de células T. Mutações específicas nessa glicoproteína estão associadas à virulência e

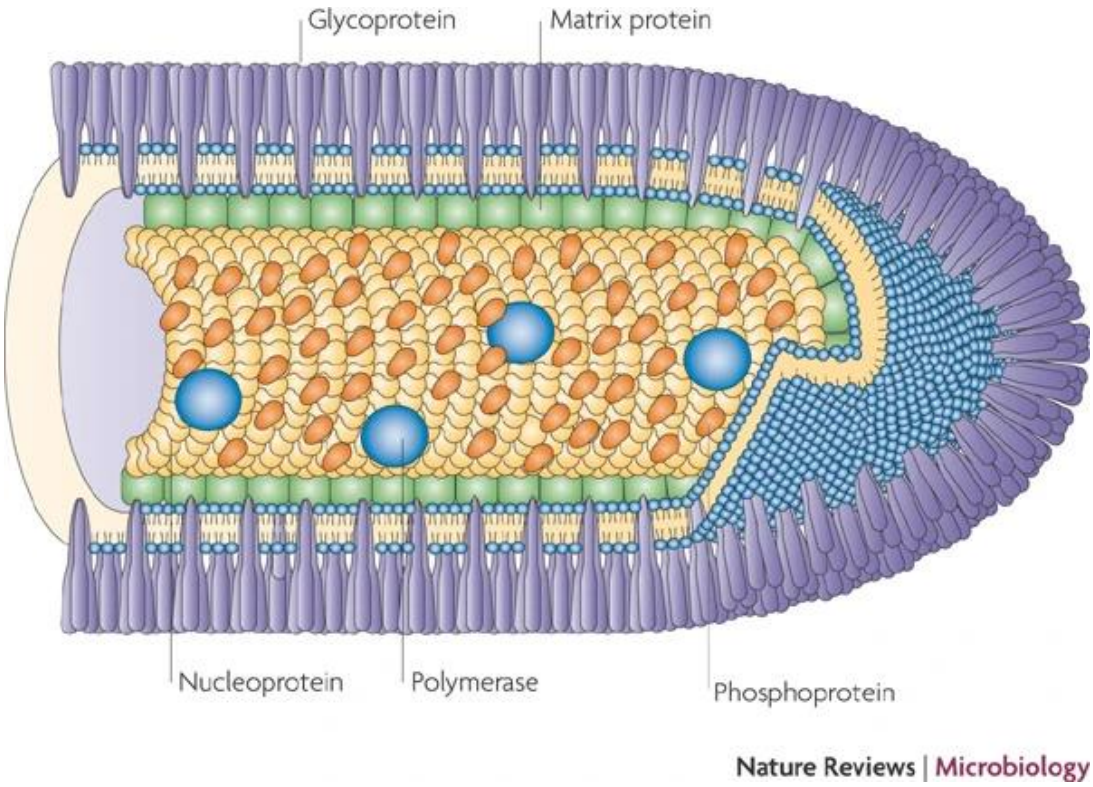
à patogênese do vírus, além de contribuir para a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (SOUZA, 2021; WUNNER et al., 2020; FAUQUET et al., 2005).

A proteína L, conhecida como "*large*", é a maior proteína do vírus, composta por 2.142 aa e com um peso molecular de 244 kDa. Ela recebe esse nome devido ao seu tamanho. Desempenha um papel crucial, sendo responsável pelas atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação do RNA viral (TORDO *et al*., 1988).

2.6 Conformação estrutural do vírus

A conformação do vírus ocorre a partir das proteínas, e a partícula viral consiste em duas estruturas principais: o ribonucleocapsídeo ou ribonucleoproteína viral (RNP) e o envelope viral. A RNP interna possui simetria helicoidal, consistindo em um complexo de RNA genômico associado às três proteínas essenciais: N, P e L. A RNP desempenha um papel fundamental na replicação e transcrição do genoma viral, servindo como modelo para ser processada pela proteína L, em conjunto com seu cofator, a proteína P (SCHNELL *et al.,* 2010; JACKSON, 2014; KUZMIN, 2015). O esqueleto do vírus é moldado pela interação entre o RNP, particularmente a proteína N, e a proteína M, uma vez que essas proteínas contribuem para a estabilidade da estrutura viral (GUICHARD *et al*., 2011; MEBATSION *et al*., 1999). Enquanto isso, o envelope viral é constituído por uma dupla camada lipídica, na qual estão incorporadas as proteínas G e M (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; FAUQUET et al., 2005; FOOKS; JACKSON, 2020). A glicoproteína é a única proteína transmembranar e se estende para fora com espículas glicosiladas compostas por trímeros que se projetam na superfície do vírion com um comprimento de 9 nm (WUNNER *et al*., 2020). Por outro lado, a proteína M encontra-se na face interna do envelope, envolvendo a ribonucleoproteína viral (figura 1) (MEBATSION, 2001).

Figura 1 – *Estrutura do Lyssavirus rabies (RABV).*

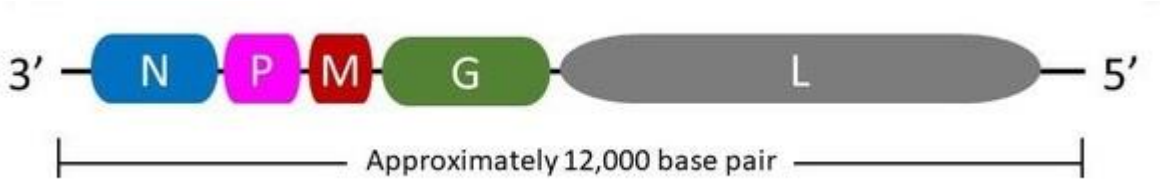


Fonte: Schnell *et al*. (2010)

O genoma do RABV é disposto na ordem 3'-N-P-M-G-L-5' e contém pequenas sequências regulatórias nas extremidades, especificamente na região *leader* 3' e na região *trailer* 5'. A região inicial *leader* 3' é constituída reiteradamente por 58 nucleotídeos, com os 9 primeiros sendo similares em todas os *Lyssavirus*. Por outro lado, a porção final, denominada como *trailer*, possui aproximadamente 70 nucleotídeos (figura 2) (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011).

.

Figura 2 - Estrutura do genoma do RABV.



Fonte: Chienwicha *et al.* (2020)

Os cinco genes de transcrição são delimitados por pequenas regiões intergênicas não codificantes: N/P (2 nucleotídeos), P/M (5 nucleotídeos), M/G (5 nucleotídeos) e G/L (19 a 28 nucleotídeos) (JACKSON, 2014; KUZMIN, 2015; MACLACHLAN; DUBOVI, 2017). A extremidade 3' do genoma, conhecida como região *leader*, atua como promotor gênico, servindo como o ponto inicial obrigatório para a transcrição dos RNAs mensageiros (RNAm) (FOOKS; JACKSON, 2020). Durante a transcrição, a RNA polimerase não transcreve o gene por completo, pois as regiões intergênicas não são codificadas. Essas regiões funcionam como sinais que indicam à RNA polimerase onde iniciar e encerrar a transcrição do gene (TORDO *et al*., 1986). Em cada ponto de início, a RNA polimerase se liga ao material a ser transcrito, e em cada ponto de término, ela se dissocia, completando o processo de transcrição (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; FOOKS; JACKSON, 2020).

2.7 Transmissão

O RABV está presente na saliva de animais infectados, tornando a mordida o principal meio de transmissão, com o vírus sendo diretamente inoculado nos tecidos da vítima, facilitando sua entrada no sistema nervoso periférico (SNP) (FOOKS *et al.*, 2014; OPAS, 2024). Arranhões e lambeduras de animais infectados também podem transmitir o vírus se a saliva entrar em contato com pele lesionada ou mucosas. Embora menos comuns, essas formas de transmissão são relevantes nos protocolos de prevenção e tratamento pós-exposição (MANNING *et al.*, 2008; OMS, 2024).

Casos raros de transmissão por aerossóis foram relatados, especialmente em ambientes laboratoriais e cavernas com morcegos. A inalação de partículas de saliva ou fezes de morcegos infectados pode resultar em contaminação. Embora rara em condições naturais, essa forma de transmissão deve ser considerada em ambientes com alta exposição a aerossóis de origem animal (KOTAIT *et al.*, 2009; MANNING *et al.*, 2008).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2019), há registros de dois casos nos Estados Unidos (EUA) onde indivíduos foram expostos ao RABV em cavernas habitadas por morcegos. Esses incidentes sublinham a importância da vigilância epidemiológica em ambientes com alta concentração de vetores zoonóticos, evidenciando o potencial de transmissão viral mesmo em situações raras.

Em dois casos adicionais, a exposição ao RABV ocorreu durante o manuseio de amostras biológicas contaminadas em laboratório. Essas infecções foram atribuídas à falta de medidas de biossegurança, como o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e vacinação pré-exposição, evidenciando os riscos substanciais associados ao trabalho com

patógenos e a necessidade de protocolos rigorosos para proteger profissionais de saúde (KOTAIT *et al.*, 2009).

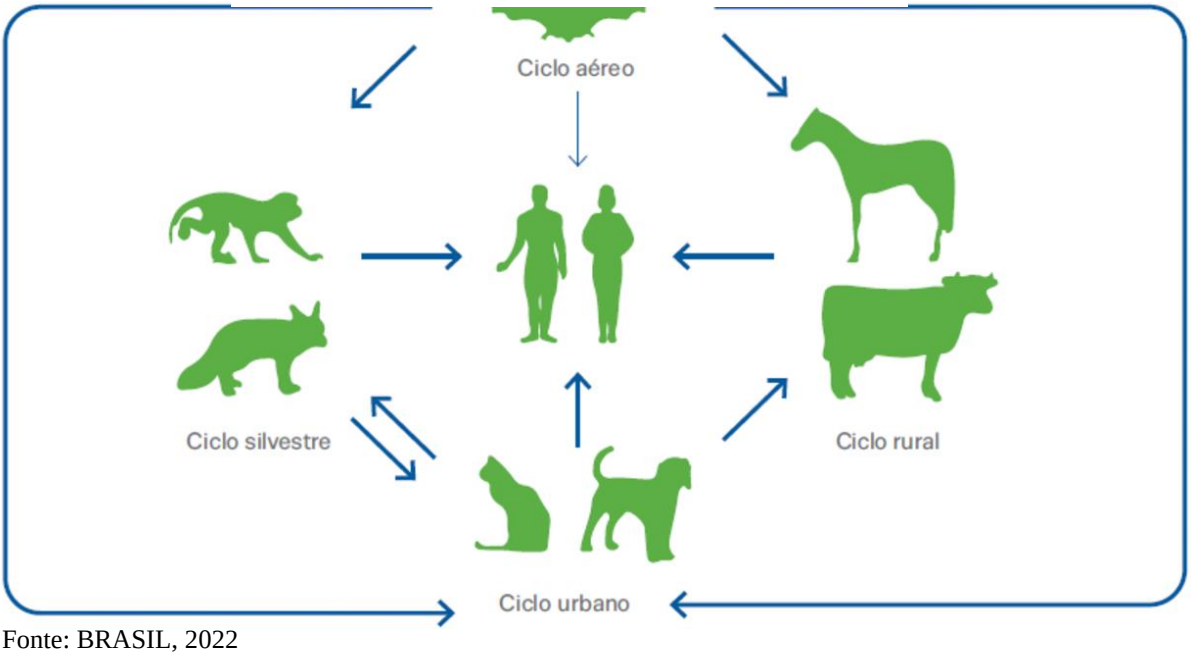
Transmissões de raiva por transplantes de órgãos e tecidos também foram reportadas, ressaltando a importância de uma triagem rigorosa para garantir a segurança dos pacientes. Indivíduos que recebem córneas, órgãos sólidos e tecidos vasculares de doadores infectados, mas sem diagnóstico prévio, correm o risco de contrair a doença (KOTAIT *et al.*, 2009).

O primeiro caso descrito ocorreu nos Estados Unidos em 2004, quando um doador infectado por mordida de morcego transmitiu raiva a quatro receptores: dois receberam rins, um o fígado e outro um segmento da artéria ilíaca. A infecção só foi identificada após o surgimento dos sintomas em três dos pacientes transplantados, com o quarto caso sendo confirmado posteriormente (SRINIVASAN *et al.*, 2005; BRONNERT *et al.*, 2007). Em 2005, um caso semelhante ocorreu na Alemanha, onde três pessoas contraíram raiva após receberem órgãos de um doador infectado por um ataque de cão na Ásia (BRONNERT *et al.*, 2007). A literatura também relata oito casos de transmissão de raiva por transplante de córneas, onde os doadores inicialmente não foram identificados como portadores do vírus. Esses incidentes reforçam a necessidade de protocolos rigorosos em transplantes para prevenir a transmissão da raiva (KOTAIT *et al*., 2009).

2.8 Cadeia epidemiológica de transmissão

O RABV é um patógeno altamente adaptável que afeta uma ampla gama de mamíferos, conferindo-lhe uma presença global. Epidemiologicamente, pode-se dizer que a raiva é classificada em quatro ciclos principais de transmissão, sendo eles: urbano, rural, silvestre terrestre e silvestre aéreo, tendo o ser humano como o hospedeiro final em todos os ciclos (figura 3), com registros de infecção tanto no Brasil quanto em outras nações. Na esfera urbana, a raiva se propaga por meio de animais de estimação como cães e gatos. No ambiente rural, a doença afeta principalmente herbívoros, incluindo bovinos, equinos, caprinos, ovinos e bubalinos. Já no contexto silvestre terrestre, a raiva é disseminada entre espécies nativas, tais como primatas, cachorros-do-mato, raposas e guaxinins. Por fim, no ciclo silvestre aéreo, os morcegos desempenham um papel crucial, pois sua habilidade de voar permite que o vírus ultrapasse fronteiras geográficas, fazendo deles os principais mantenedores do vírus e vetores essenciais na propagação do RABV (WADA *et al*., 2011).

Figura 3 – Cadeia epidemiológica de transmissão da raiva.



Fonte: BRASIL, 2022

O ciclo urbano da raiva é predominantemente caracterizado pela transmissão do vírus entre cães e gatos, com o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) sendo o hospedeiro natural mais comum. Na forma conhecida como raiva furiosa, os animais afetados exibem comportamento extremamente agressivo. A proximidade entre cães e humanos aumenta o risco de transmissão para pessoas, geralmente através de mordidas. A raiva urbana representa uma significativa preocupação de saúde pública, especialmente em regiões com controle insuficiente da doença em populações caninas, como em algumas áreas da Ásia e África (KOTAIT *et al.*, 2009).

No Brasil, o ciclo urbano da raiva tem apresentado avanços significativos graças às estratégias de vigilância epidemiológica e às campanhas de vacinação (BRASIL, 2004). Contudo, apesar do controle da raiva urbana no país, ainda há registros de casos em cães e gatos causados por variantes do vírus transmitidas por morcegos. Embora menos frequentes, esses casos representam um risco importante para a saúde pública e exigem atenção contínua para prevenir sua disseminação. Animais domésticos, uma vez infectados por variantes do vírus da raiva provenientes de morcegos, podem transmitir a doença para humanos. O primeiro caso mundial deste ciclo secundário – morcego-gato-homem – foi registrado em uma área urbana de um município do interior do estado de São Paulo, em 2001 (KOTAIT *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, o estado de Minas Gerais registrou um aumento nos casos de raiva transmitida por morcegos para animais de pequeno porte. Entre 2019 e 2022, foram documentados oito casos dessa doença nesses animais na região. Dentre esses casos, destaca-se o ocorrido em dezembro de 2021, quando foi confirmado um caso de raiva em um gato encontrado no telhado de uma residência na região da Pampulha, em Belo Horizonte. Esse incidente marcou o primeiro registro da doença em felinos na cidade em 36 anos, desde o último caso registrado em 1985. Além disso, em maio de 2022, outro caso de raiva foi confirmado em um cão na região noroeste da cidade. Exames laboratoriais subsequentes revelaram que a variação antigênica do vírus que infectou tanto o gato, quanto o cão, foi transmitida por morcegos hematófagos.

No ciclo rural, os morcegos hematófagos desempenham um papel central como principais reservatórios e transmissores do RABV, afetando principalmente animais de produção, como bovinos, equinos, caprinos, ovinos e suínos (MAYEN, 2003; STREICKER *et al.*, 2012). Na América Latina, três espécies de morcegos hematófagos são encontradas: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*, todas exclusivas da região, com distribuição que se estende desde o México até a metade da Argentina, incluindo uma estreita faixa no Chile (KOTAIT *et al.*, 2009). Porém, enquanto *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii* possuem hábitos alimentares altamente especializados, alimentando-se exclusivamente de sangue de aves silvestres, o *Desmodus rotundus* se diferencia por se alimentar de mamíferos, incluindo gado e humanos (figura 4). Essa distinção nos hábitos alimentares confere ao *D. rotundus* um impacto direto e significativo na transmissão do vírus. Por essa razão, destaca-se das demais espécies e é amplamente reconhecido como o principal vetor nesse ciclo (MAYEN, 2003; STREICKER *et al.*, 2012).

A transmissão do RABV, especialmente quando envolve morcegos hematófagos, apresenta implicações que vão além da saúde animal, impactando significativamente a saúde humana e o setor agropecuário. Esse ciclo gera impactos econômicos significativos, incluindo perdas de animais de produção, altos custos com tratamentos veterinários e despesas relacionadas à implementação de medidas de controle. Além disso, representa um risco relevante para a saúde pública, devido à possibilidade de transmissão do vírus para humanos (MAYEN, 2003; STREICKER *et al.*, 2012). A transmissão ocorre principalmente através do contato direto com animais infectados, especialmente entre profissionais que atuam na área sem a profilaxia pré-exposição adequada (SHEENA *et al.*, 2020).

A gravidade dessa situação é evidenciada por casos como o de 2006, quando um médico-veterinário em Minas Gerais foi infectado ao manipular herbívoros raivosos sem a

devida proteção. Mais recentemente, em 2023, um caso humano foi confirmado no município de Mantena, Minas Gerais, envolvendo um produtor rural que teve contato com um bezerro apresentando sintomas neurológicos. Esses episódios sublinham a importância crítica de vacinas preventivas, além da implementação rigorosa de medidas de controle e prevenção para evitar a propagação da doença.

Figura 4 – Morcego hematófago (morcego vampiro) da espécie *Desmodus rotundus.*

Fonte: Lamar University, 2012.

No ciclo silvestre aéreo, os morcegos, ou quirópteros, desempenham um papel crucial na manutenção e transmissão do vírus da raiva entre si, independentemente de serem hematófagos ou não. Todas as espécies de morcegos são suscetíveis à infecção, atuando tanto como reservatórios do vírus quanto como vetores capazes de transmiti-lo a outras espécies. Entretanto, além de serem transmissores da doença, esses morcegos também manifestam sintomas clínicos e não sobrevivem à infecção, o que impede que atuem como portadores assintomáticos (KOTAIT *et al.*, 2009).

Na América Latina, a raiva humana resultante de ataques por morcegos hematófagos é um fenômeno recorrente, frequentemente vinculado à escassez de fontes alimentares naturais e às mudanças ambientais induzidas pela ação antrópica. A região amazônica, abrangendo países como Brasil, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela, destaca-se como uma área particularmente

suscetível a esses incidentes, sublinhando a necessidade de monitoramento contínuo e da implementação de medidas preventivas rigorosas (KOTAIT *et al.*, 2009).

O Brasil, em particular, abriga uma das faunas de morcegos mais diversificadas do mundo, com 182 espécies documentadas (GARBINO *et al.*, 2020). Dentre essas, 41 espécies de morcegos não hematófagos foram identificadas como portadoras do vírus da raiva (SODRÉ *et al.*, 2010). A presença desses morcegos infectados em áreas urbanas representa um risco significativo para a saúde pública, pois muitos deles exibem hábitos sinantrópicos, vivendo em estreita proximidade com ambientes humanos. Essa convivência próxima aumenta a probabilidade de interações entre morcegos, pessoas e animais domésticos, elevando substancialmente o risco de transmissão (KOTAIT *et al.*, 2009).

Recentemente, o país tem enfrentado um aumento significativo na transmissão da raiva para humanos, com um impacto particularmente agudo no estado de Minas Gerais. Em 2022, foram registrados quatro casos de raiva humana, todos envolvendo crianças indígenas da etnia *Maxakali*, residentes na zona rural do município de Bertópolis. Em 2024, a situação se agravou em Belo Horizonte, a capital do estado, que observou uma preocupante elevação no número de morcegos infectados, com 11 casos documentados até junho. Esses incidentes destacam a crescente gravidade da situação e sublinham a urgência de medidas de vigilância intensificadas e intervenções contínuas.

O aumento crescente de raiva em humanos e morcegos em Minas Gerais enfatiza a urgência de um monitoramento robusto e a implementação de estratégias preventivas eficazes. Tais medidas são essenciais para proteger tanto a fauna quanto a população humana contra os riscos associados a essa doença potencialmente fatal. A integração de esforços de vigilância, educação comunitária e controle de animais selvagens é crucial para enfrentar o desafio representado pela raiva e reduzir a sua disseminação.

No ciclo silvestre terrestre, a transmissão da raiva ocorre entre diversas espécies de mamíferos e envolve diferentes variantes antigênicas do vírus. Este ciclo é predominantemente caracterizado por carnívoros selvagens, como raposas, coiotes, chacais e guaxinins, que atuam como reservatórios naturais do vírus. Esses animais podem contrair a infecção e transmiti-la através de mordidas, arranhões ou contato com a saliva, estabelecendo um ciclo contínuo de manutenção e propagação da doença na natureza (KOTAIT *et al.*, 2009).

No Brasil, a raiva silvestre representa um desafio significativo para a saúde pública, particularmente devido à prevalência em espécies como o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). Estes animais desempenham um papel crucial como reservatórios do vírus, contribuindo para a manutenção e disseminação da raiva tanto em

ambientes silvestres quanto urbanos. A interconexão entre esses ciclos silvestres e as áreas urbanas sublinha a complexidade do controle da doença e a necessidade de estratégias abrangentes de vigilância e prevenção para mitigar os riscos associados à raiva em diferentes contextos ecológicos (KOTAIT *et al*., 2009).

Nos últimos tempos, observou-se um aumento nos casos de transmissão de raiva humana através do contato com cachorros-do-mato infectados. Particularmente no Nordeste brasileiro este fenômeno sugere uma possível adaptação do vírus da raiva, originalmente associado a cães domésticos, à população de animais silvestres, refletindo o sinantropismo desses animais na região (KOTAIT *et al*., 2009). Simultaneamente, o sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) tem sido identificado como um reservatório relevante para o vírus da raiva. No estado do Ceará, por exemplo, uma nova variante do RABV foi detectada em casos de raiva humana associados a esses primatas. A prática comum de manter saguis como animais de estimação contribui para a elevação do risco de transmissão da doença para humanos (AGUIAR *et al*., 2012).

O gerenciamento e a prevenção da raiva silvestre apresentam obstáculos complexos. A dificuldade em vacinar animais selvagens e a impossibilidade de erradicar completamente os reservatórios silvestres constituem desafios significativos. Além disso, a intervenção humana na fauna, como a urbanização e a captura e domesticação de animais selvagens, apesar de ilegal, contribui para a propagação viral. A carência de conhecimento detalhado sobre a ecologia da doença em morcegos, primatas não humanos e canídeos selvagens restringe a capacidade de antecipar a ocorrência e a localização de novos casos ou surtos, complicando os esforços de controle e prevenção (ROCHA, 2014).

2.9 Aspectos clínicos

A raiva é uma zoonose viral que pode afetar todos os mamíferos, causando sintomas neurológicos graves e frequentemente fatais. Historicamente, a raiva tem sido dividida em duas formas clássicas: furiosa e paralítica, sendo que a manifestação clínica depende da variante viral envolvida, cada uma apresentando diferentes padrões epidemiológicos e clínicos.

A raiva furiosa está associada ao ciclo urbano, sendo isolada em cães, gatos e humanos, caracterizando-se, principalmente, por grande irritabilidade e agressividade. Em contrapartida, a raiva paralítica ocorre no ciclo silvestre e rural, sendo isolada em herbívoros e morcegos, apresentando marcada debilidade e paralisia dos membros posteriores (BEER, 1988; CEPANZO, 1989ª; FENNER *et al*., 1987; GERMANO, 1988).

Essa doença é considerada endêmica em várias regiões do Brasil, com os bovinos sendo os mais afetados (MARCOLONGO-PEREIRA *et al*., 2010). No entanto, nos últimos anos, observou-se uma mudança epidemiológica significativa, com um aumento de casos de raiva paralítica em animais domésticos, como cães e gatos, que tradicionalmente eram mais associados à forma furiosa.

A raiva, em ambas as suas formas, furiosa e paralítica, é uma doença devastadora e fatal. A vacinação de animais domésticos e selvagens, bem como a rápida administração da profilaxia pós-exposição em seres humanos, são medidas cruciais para prevenir a doença. A conscientização sobre os sintomas e a urgência no tratamento são essenciais para salvar vidas e controlar a propagação do vírus (MARCOLONGO-PEREIRA *et al*., 2010).

2.9.1 Raiva furiosa

A forma furiosa da raiva é a mais prevalente em cães domésticos e gatos. Caracteriza-se por uma série de sintomas que refletem uma intensa excitação do sistema nervoso central. Os animais afetados podem exibir comportamento extremamente agitado, episódios de hiperatividade e excitação, resultado da encefalite provocada pelo vírus (RUPPRECHT *et al.*, 2002).

Um sintoma distintivo da raiva furiosa é a hidrofobia, um medo intenso de água. Mesmo a visão ou o som da água pode induzir espasmos dolorosos na garganta e na laringe, dificultando a deglutição (JACKSON, 2013). Além disso, a aerofobia, o medo de correntes de ar, pode resultar em espasmos musculares e dificuldades respiratórias, manifestando-se como hiporreflexia decorrente da irritação do sistema nervoso central (WARRELL, 2015).

Animais com raiva furiosa também apresentam sialorreia, uma produção excessiva de saliva devido à dificuldade de deglutição, o que gera uma aparência de "espuma" na boca. Este sintoma está associado à disfunção autonômica provocada pelo vírus (HEMACHUDHA *et al.*, 2013). Adicionalmente, podem ocorrer alucinações visuais e auditivas, confusão mental e agressividade, refletindo a invasão viral e a inflamação do encéfalo (MADHUSUDANA *et al.*, 2002).

De acordo com Kotait *et al.* (2009), os animais acometidos pela raiva furiosa tendem a se esconder em locais escuros e a se tornar agressivos, com uma propensão aumentada para morder. Além disso, o latido dos cães pode se tornar rouco ou bitonal. Com frequência, esses animais abandonam suas residências e percorrem grandes distâncias, durante as quais podem atacar outros animais e disseminar o vírus. Na fase terminal da doença, é comum observar convulsões generalizadas, incoordenação motora e paralisia do tronco e dos membros. Essa

sintomatologia é consistente tanto em cães, quanto em gatos, refletindo a gravidade e a uniformidade da manifestação clínica da raiva furiosa. A rápida deterioração do estado neurológico e a agressividade exacerbada desses animais ressaltam a importância de intervenções urgentes e eficazes para a contenção e controle da propagação da doença.

2.9.2 Raiva paralítica

A raiva paralítica era predominantemente observada em herbívoros no ciclo rural, com bovinos sendo os mais afetados. Este ciclo é mantido principalmente por morcegos hematófagos, como o *Desmodus rotundus*, que transmitem o vírus a partir de sua mordida (HEMACHUDHA *et al*., 2013). No entanto, recentes dados epidemiológicos indicam uma crescente incidência de raiva paralítica em animais domésticos, refletindo uma mudança na dinâmica da transmissão e no comportamento das populações de vetores.

A raiva paralítica apresenta várias manifestações clínicas graves, refletindo a progressão da infecção viral no SNC. Inicialmente, a doença se manifesta com fraqueza muscular que progride para paralisia flácida. Os músculos próximos ao local da mordida são os primeiros a serem afetados, mas a paralisia pode se espalhar para outras partes do corpo (HEMACHUDHA *et al*., 2013). Com a progressão da paralisia, os reflexos musculares diminuem ou desaparecem completamente, devido à invasão viral das células nervosas e à destruição dos neurônios motores (RUPPRECHT *et al*., 2002). Além disso, os pacientes geralmente apresentam uma diminuição da atividade mental e física, tornando-se cada vez mais letárgicos e apáticos, refletindo a disfunção generalizada do SNC. A paralisia dos músculos respiratórios pode levar à insuficiência respiratória, frequentemente resultando em óbito. Esta insuficiência ocorre devido à paralisia dos nervos cranianos e dos músculos intercostais, que são essenciais para a função respiratória adequada (WARRELL *et al.*, 2013).

2.10 A raiva em herbívoros

A raiva, uma zoonose de notificação compulsória, é uma das doenças mais graves para a saúde pública devido à sua alta letalidade e aos impactos socioeconômicos significativos (BRASIL, 2009). Como mencionado anteriormente, o Brasil registrou uma redução considerável na incidência de raiva urbana transmitida por cães e gatos, resultado do sucesso das campanhas de vacinação em massa (DA ROSA *et al*., 2006; BRASIL, 2004). No entanto, a persistência do vírus em morcegos hematófagos representa um desafio crescente. Esta espécie de morcego é o principal vetor da raiva entre herbívoros, afetando principalmente bovinos

através de mordeduras ou lambeduras durante o repasto sanguíneo (DA ROSA *et al*., 2006; SCHNEIDER *et al*., 2009; BRASIL, 2009).

Segundo informações do MAPA, estima-se que a doença em herbívoros em países latino-americanos resulte em perdas anuais significativas, alcançando centenas de milhões de dólares devido à mortalidade de milhares de cabeças de gado.

No Brasil, a raiva tem sido um problema sério para o setor agropecuário desde 1911, quando o primeiro surto em bovinos e equinos foi oficialmente registrado no Sul do país. Desde então, a doença é considerada endêmica em todo o território nacional, apresentando uma distribuição epidemiológica heterogênea com variações significativas conforme as diferentes regiões geográficas (BRASIL, 2009).

Em herbívoros, entre os estados brasileiros, no período de 2005 a 2023, Mato Grosso foi o mais impactado, com um total de 3.502 casos registrados, seguido por Minas Gerais com 2.853 casos e o Rio Grande do Sul com 2.342 casos. Essas regiões apresentam características agropecuárias intensivas e populações significativas de herbívoros, o que pode ter contribuído para o maior número de casos de raiva (BRASIL, 2024).

Analisando os dados epidemiológicos mais recentes, referentes ao período de 2019 a 2023, observa-se uma mudança significativa na distribuição de casos entre os estados. O estado de Mato Grosso, que historicamente liderava em número de animais infectados, apresentou um declínio acentuado, com apenas 241 diagnósticos positivos nesse intervalo, dos quais 13 ocorreram em 2023. Essa redução pode estar associada a medidas mais eficazes de controle e prevenção, incluindo vacinação mais abrangente e controle de vetores. Por outro lado, o Rio Grande do Sul, que anteriormente ocupava a terceira posição em número total de casos, obteve 249 casos entre 2019 e 2023, sendo 62 destes apenas no último ano. Já Minas Gerais, que ocupava a segunda posição, manteve-se com altos números, registrando 441 casos no mesmo período, dos quais 72 foram em 2023 (BRASIL, 2024).

Os elevados casos de raiva em herbívoros em Minas Gerais podem ser explicados pela combinação de fatores favoráveis à presença de morcegos vampiros, como a abundância de rebanhos bovinos, que oferecem alimento constante, e a disponibilidade de abrigos em construções humanas, como túneis, cisternas e casas abandonadas. Além disso, as condições ambientais, como temperatura, umidade e baixa luminosidade, criam um microclima ideal para a proliferação desses morcegos, facilitando a disseminação do vírus da raiva na região (MAPA, 2023).

A implementação de políticas públicas robustas é essencial para o controle e prevenção da raiva em herbívoros. Desde 1966, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) do Brasil, através da Divisão de Defesa Sanitária Animal, lançou o Plano de Combate à Raiva dos Herbívoros, atualmente conhecido como Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH). Gerido pelo Departamento de Saúde Animal (DSA), o programa reflete o compromisso contínuo do governo federal na luta contra essa zoonose, destacando a importância de estratégias integradas e persistentes para o controle da doença (BRASIL, 2009).

Além das diretrizes federais, diversas unidades federativas brasileiras implementam legislações específicas que complementam as normas nacionais, reforçando o controle da raiva em nível estadual. Em MG, o Instituto Mineiro de Agropecuária desempenha um papel fundamental na execução das estratégias delineadas pelo PNCRH por meio do Programa Estadual de Controle da Raiva dos Herbívoros (PECRH). Esse programa estadual adota uma série de medidas eficazes, como a vacinação sistemática dos herbívoros, campanhas educativas direcionadas aos produtores rurais, e a captura e controle de morcegos hematófagos. Além disso, o IMA realiza monitoramento contínuo das áreas de risco e diagnósticos laboratoriais, o que é essencial para o aprimoramento constante das estratégias de controle e prevenção da raiva (BRASIL, 2009).

A importância dessas medidas vai além da proteção dos rebanhos, estendendo-se à saúde pública. A raiva é uma doença fatal com potencial de transmissão zoonótica, representando um risco significativo para as comunidades rurais e trabalhadores do setor agropecuário. Assim, a redução da incidência da doença em herbívoros é fundamental para a proteção da saúde humana. Além disso, manter baixas taxas de incidência é vital para a sustentabilidade da produção pecuária e para a economia rural, destacando a necessidade de investimentos contínuos em pesquisa, prevenção e controle da doença (BRASIL, 2009).

2.11 Diagnóstico da raiva animal

O diagnóstico precoce da raiva é essencial para uma gestão eficaz da saúde pública e animal, proporcionando a base para intervenções rápidas e efetivas que minimizam a disseminação do vírus (GIGANTE *et al*., 2018). A capacidade de detectar a doença rapidamente não só facilita a contenção viral, mas também direciona as estratégias de controle e prevenção de forma informada e precisa (BRASIL 2009). Em Minas Gerais, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), através do seu Laboratório de Saúde Animal (LSA), tem um papel determinante na realização de testes laboratoriais que confirmam a presença do vírus, garantindo que as ações de combate sejam fundamentadas em dados concretos e atualizados.

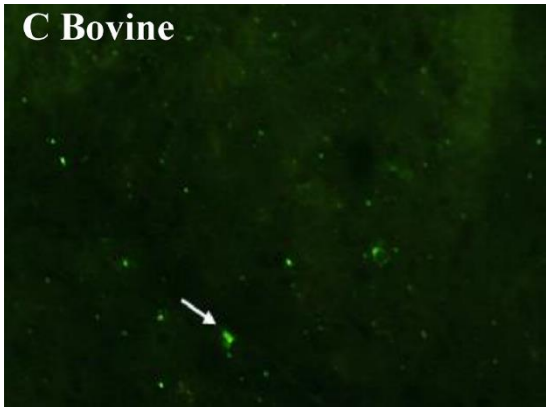
2.11.1 Imunofluorescência Direta (IFD)

Dado o potencial quase letal do RABV, é imperativo que o diagnóstico seja realizado de maneira rápida e com alta confiabilidade. Isso assegura a implementação eficiente de medidas profiláticas e epidemiológicas. Conforme recomendado pela OMS e pela OMSA a Imunofluorescência Direta é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico *post mortem* da doença (FOOKS, 2018; RUPPRECHT, FOOKS, ABELA-RIDDER, 2018). Essa técnica é amplamente favorecida devido à sua alta sensibilidade, estimada em aproximadamente 95%, e especificidade de cerca de 99%. Além disso, oferece a vantagem de proporcionar resultados rápidos, o que é essencial em cenários onde a agilidade no diagnóstico pode significar a diferença entre a vida e a morte em casos suspeitos de raiva (GERMANO *et al*., 1977; GIGANTE *et al*., 2018; RUPPRECHT *et al*., 2014; RUPPRECHT *et al*., 2018).

O procedimento começa com a coleta de amostras adequadas de tecido encefálico, frequentemente obtidas de regiões como tálamo, córtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal. As amostras são então impressas e fixadas em lâminas de microscopia. Após a fixação, os tecidos são tratados com anticorpos conjugados a fluorescentes específicos para o antígeno do vírus da raiva. Quando os anticorpos se ligam a qualquer partícula viral presente no tecido do hospedeiro, emitem um sinal fluorescente, que pode ser visualizado sob iluminação adequada no microscópio de fluorescência (figura 5). Esse sinal fluorescente permite a identificação precisa da presença do vírus da raiva nas amostras de tecido analisadas. No entanto, quando o resultado é negativo, não ocorre a ligação dos anticorpos às partículas virais, e, portanto, nenhum sinal fluorescente é emitido (figura 6). Essa ausência de fluorescência indica que não há presença do vírus no tecido analisado, confirmando um resultado negativo para a infecção (BRASIL, 2019; KOTAIT *et al*., 2009).

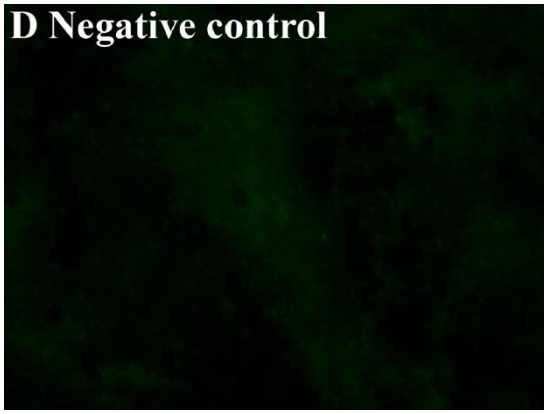
.

Figura 5 – Lâmina de Imunofluorescência Direta positiva para o diagnóstico de raiva.



Fonte: Bartaquini *et al*. (2020).

Figura 6 - Lâmina de Imunofluorescência Direta negativa para o diagnóstico de raiva.



Fonte: Bartaquini *et al*. (2020).

Entretanto, a IFD possui algumas limitações. A acurácia do teste depende diretamente de fatores como a habilidade e experiência do laboratorista em distinguir entre amostras inespecíficas e positivas, a qualidade do conjugado antirrábico usado na reação antígeno-anticorpo, o acesso e a qualidade do microscópio de fluorescência utilizado, e o estado de conservação das amostras. Amostras em decomposição ou desnaturadas podem reduzir significativamente a sensibilidade da técnica (DEAN, ABLESETH, ATANASIU, 1996).

Devido a essas limitações, a OMS recomenda complementar a IFD com métodos diagnósticos adicionais para confirmar os resultados, especialmente em casos negativos ou inconclusivos. A combinação da IFD com outras técnicas diagnósticas, aumenta significativamente a precisão dos resultados, assegurando intervenções mais eficazes e minimizando o risco de falso-negativos (WHO, 2018; CENTOAMORE *et al*., 2020). Além disso, diversos estudos indicam que os equinos apresentam menor sensibilidade à IFD no

diagnóstico da raiva, destacando a importância de utilizar testes confirmatórios adicionais para essa espécie animal (BASSUINO *et al*., 2016; PEIXOTO *et al*., 2000; SOUZA, 2019).

Dentre os diferentes métodos utilizados como testes confirmatórios, destacam-se o Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC), Inoculação em Camundongo, Imunohistoquímica (IHC) e as técnicas moleculares como RT-PCR e RT-qPCR. Cada uma dessas técnicas oferece vantagens específicas que complementam o diagnóstico da raiva, aumentando a precisão e a confiabilidade dos resultados. (RUPPRECHT *et al*., 2018).

2.11.2 Inoculação em Camundongo

A IC é recomendada pela OMS como método complementar para confirmar os resultados da IFD. Essa técnica apresenta alta sensibilidade e é eficaz na propagação e amplificação do agente etiológico, permitindo a detecção do RABV mesmo em amostras com baixa carga viral, uma vez que promove a replicação do vírus nas células neuronais. Devido a essa capacidade de amplificação, a IC Pode gerar resultados positivos mesmo em situações onde outras metodologias, como a IFD, falharam em detectar o vírus (CENTOAMORE *et al*., 2017; MESLIN *et al*., 1996). Além disso, o método oferece a vantagem de preservar o agente etiológico para estudos posteriores, proporcionando uma fonte contínua de material biológico para pesquisas futuras (BOURHY *et al*., 1989; KOPROWSKI, 1996).

A técnica de IC consiste em inocular intracerebralmente um grupo de camundongos, utilizando uma amostra do animal suspeito. O grupo pode incluir camundongos com idade entre 3 e 4 semanas ou neonatos de 2 a 5 dias de idade. Os camundongos são observados por um período de 30 dias, e qualquer camundongo que venha a falecer durante esse período é submetido a exames por meio da IFD. Esse procedimento permite a detecção do vírus da raiva no SNC, confirmando a presença do patógeno e validando os resultados obtidos em etapas anteriores (BRASIL, 2009).

Entretanto, a IC é um teste oneroso, envolvendo altos custos e recursos. Além do tempo necessário para obtenção dos resultados, há despesas relacionadas ao manejo e manutenção dos animais de laboratório, somadas às crescentes preocupações com o bem-estar animal (BRASIL, 2009; RUSSEL, BURCH, 1992). Sendo assim, o isolamento em cultivo celular, que é uma técnica sensível, rápida e de baixo custo, tem sido recomendada como método alternativo, visando reduzir e substituir o uso de animais de experimentação, alinhando-se com os princípios éticos e práticos na pesquisa científica. No entanto, essa técnica ainda é pouco implementada em laboratórios na América Latina (NASRAUI, 2020). No Brasil, a maioria dos laboratórios que fazem parte dos sistemas de vigilância epidemiológica da raiva utiliza as técnicas de IFD e

IC para o diagnóstico, evidenciando a persistência de métodos tradicionais em determinados contextos, mesmo com a disponibilidade de alternativas mais recentes (MARINHO *et al*., 2024).

2.11.3 Aplicação de métodos moleculares no diagnóstico da raiva

Um método alternativo como teste confirmatório que tem ganhado popularidade é o uso de técnicas moleculares, como a RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e a RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) (LOPES, 2008). Embora a RT-PCR seja utilizada como método diagnóstico para raiva há décadas, foi apenas recentemente que recebeu recomendação oficial da OMSA/WOAH (Organização Mundial da Saúde Animal ou *World Organisation for Animal Health*) (WOAH, 2023a). Essas técnicas são cada vez mais empregadas como complemento à IFD e estão progressivamente substituindo a prova biológica. O uso de técnicas moleculares como método complementar no diagnóstico da raiva representa um avanço significativo, proporcionando maior precisão diagnóstica e fortalecendo a ética científica. Essas técnicas têm viabilizado o desenvolvimento de alternativas promissoras, oferecendo benefícios adicionais, especialmente em termos de rapidez, exatidão e capacidade de detectar infecções em estágios iniciais (FOOKS *et al.*, 2009)

A utilização de protocolos convencionais de RT-PCR para a amplificação diagnóstica de fragmentos do genoma do *Lyssavirus* tem se mostrado uma abordagem eficaz e amplamente adotada na detecção desse vírus (FOOKS *et al*., 2007). Diversos estudos já publicaram metodologias detalhadas, evidenciando a importância dessa técnica. A escolha dos *primers* é crucial e, normalmente, são selecionados de regiões conservadas do genoma viral. A maioria dos ensaios se concentra na amplificação de partes do gene N, cuja região inicial é altamente conservada entre todas as espécies do gênero *Lyssavirus*. Isso significa que a sequência nucleotídica inicial do gene é similar ou idêntica entre as distintas espécies dentro desse gênero. Essa conservação inicial do gene permite o uso de *primers* em testes diagnósticos que detectam de forma universal todos os *Lyssavirus* (WUNNER, 2007). Apesar dessa conservação, os vírus desenvolveram mecanismos de adaptação aos respectivos hospedeiros, resultando em pequenas sequências de nucleotídeos dentro do gene N que são distintas e podem ser identificadas por essas alterações genéticas conservadas na região codificadora N. Essas mutações são conservadas em isolados virais circulando dentro de uma mesma espécie hospedeira e podem ser usadas como marcadores genéticos (SCHAEFER *et al*., 2005). Devido a essas características, a sequência do gene da proteína N é uma excelente candidata para estudos de tipificação genética, epidemiologia molecular e análise da diversidade e evolução do RABV.

Isso porque permite a identificação precisa de linhagens, sublinhagens e variantes virais, possibilitando rastrear os padrões do vírus até seu hospedeiro de origem e área de distribuição geográfica. Além disso, a análise da sequência do gene N facilita a comparação entre diferentes isolados, fornecendo dados consistentes e confiáveis para a análise genética e vigilância epidemiológica (ALMEIDA *et al*., 2020; ITO *et al*., 2002; MOCHIZUKI *et al*., 2012; SCHAEFER *et al.*, 2004; SOUZA, 2021).

Um estudo notável que explorou o gene N como alvo para a tipificação genética foi realizado por Schaefer *et al*. (2005). Neste trabalho, os pesquisadores conduziram uma análise detalhada das sequências do gene N de isolados do RABV provenientes de diversos hospedeiros, incluindo morcegos hematófagos, insetívoros e frugívoros, além de cães domésticos e canídeos selvagens. A análise genômica das sequências demonstrou que as cepas virais circulantes em diferentes hospedeiros apresentavam mutações pontuais específicas no gene N, o que permitiu não apenas a distinção das diferentes cepas virais, mas também a determinação do hospedeiro de origem. Essas descobertas sublinham a capacidade da tipificação genética baseada no gene N de rastrear a transmissão viral e de identificar os ciclos naturais de infecção associados a diferentes espécies hospedeiras.

Além dos p*rimers* que utilizam regiões do gene N para amplificação, há também estudos que empregam protocolos para amplificar a região do gene L. O gene L é notável por possuir blocos bem conservados, facilitando a detecção e identificação do vírus. Um estudo conduzido por Dacheux (2008) utilizou p*rimers* específicos para essa região, obtendo uma alta taxa de positividade: 98,3% em amostras de saliva e 70,2% em biópsias de pele. Esses resultados demonstram a eficiência dos *primers* direcionados ao gene L na detecção do RABV em diferentes tipos de amostras biológicas (CASTILHO *et al*., 2013; DACHEUX *et al*., 2008).

Pesquisas também destacam a importância da amplificação do gene da glicoproteína (G) e da região intergênica G-L para o diagnóstico e identificação do RABV utilizando a técnica de multiplex RT-PCR, aplicada a isolados de diversas espécies hospedeiras no Brasil. A escolha do gene G, que codifica a glicoproteína viral, é estratégica devido à sua função essencial na entrada do vírus nas células hospedeiras e sua alta imunogenicidade. Além disso, a região intergênica G-L é igualmente importante, oferecendo informações adicionais sobre a variabilidade genética do vírus (CASTILHO *et al*.,2013)

Apesar disso, embora a OMS recomende métodos moleculares convencionais baseados em gel de agarose, como o RT-PCR acompanhado de sequenciamento nucleotídico, para o diagnóstico *ante mortem* em humanos, essas técnicas não são consideradas adequadas como testes primários para o diagnóstico *post mortem*. Para evitar resultados falso-negativos e falso-

positivos no uso dessas técnicas, é essencial seguir protocolos rigorosos. A ocorrência de resultados falso-positivos é frequentemente atribuída à contaminação cruzada de amostras negativas com produtos amplificados, por outro lado, resultados falso-negativos podem ser causados pela presença de substâncias que inibem a replicação do ácido nucleico ou por falhas nas etapas de extração, transcrição reversa ou amplificação (CHIERATO, 2021; RUPPRECHT *et al*., 2019).

Um ensaio que está se tornando cada vez mais popular nos laboratórios diagnósticos e que tem potencial para substituir o RT-PCR é o RT-qPCR. Este método é mais rápido e eficiente, utilizando fragmentos menores em comparação ao RT-PCR convencional e eliminando a necessidade de uma etapa de eletroforese posterior. As reações moleculares ocorrem inteiramente dentro de um tubo fechado, o que reduz significativamente as chances de contaminação cruzada, diminuindo a incidência de resultados falso-positivos (MCELHINNEY *et al*., 2020; RUPPRECHT; FOOKS; ABELARIDDER, 2019).

Numerosos ensaios de RT-qPCR têm sido reportados para a detecção de *Lyssavirus*. Alguns desses testes foram especificamente concebidos para identificar cepas ou linhagens individuais do vírus, enquanto outros foram desenvolvidos para detectar uma variedade maior de cepas do vírus da raiva e outras espécies de *Lyssavirus* (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

O CDC, em Atlanta, EUA, desenvolveu um ensaio, que utiliza um conjunto avançado de *primer*s degenerados e uma sonda de hidrólise (*TaqMan*), chamado LN34 Pan-*Lyssavirus*. Este conjunto utiliza bases modificadas por LNA (*Locked Nucleic Acid ou* Ácido Nucleico Bloqueado) e amplifica e detecta uma região no início do genoma que é altamente conservada entre espécies divergentes *de Lyssavirus*. Essa tecnologia permite a amplificação de uma região de 165 nucleotídeos, abrangendo a sequência *leader*, o sinal de iniciação da transcrição e parte da sequência de codificação do gene da nucleoproteína. Os *primers Forward* do LN34 consistem em um multiplex de dois oligonucleotídeos, direcionados ao início do genoma do vírus. O p*rimer reverse*, por sua vez, é direcionado ao gene N e possui seis modificações degeneradas de nucleotídeos, aumentando sua eficiência e especificidade. A sonda LN34 é projetada para ter como alvo a sequência do sinal de iniciação da transcrição e contém uma única pirimidina degenerada (C ou T) na posição 65. Esta característica aumenta a capacidade da sonda de detectar uma variedade de sequências de *Lyssavirus* (GIGANTE *et al*., 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019; WADHWA *et al*., 2017). Os resultados do teste LN34 têm sido promissores, mostrando alta sensibilidade e especificidade na detecção de *Lyssavirus*. Devido a essa eficácia, a OMS recomendou o uso do LN34 como método

confirmatório para o diagnóstico da raiva. Este ensaio representa um avanço significativo nas estratégias de controle e prevenção da raiva, proporcionando uma ferramenta confiável para a detecção rápida e precisa do vírus (GIGANTE *et al*., 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019; WADHWA *et al*., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar o teste de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para o diagnóstico da raiva, comparando seu desempenho com o teste padrão-ouro, a Imunofluorescência Direta, em 149 amostras de SNC de herbívoros provenientes de diversos municípios de Minas Gerais, encaminhadas ao LSA/IMA para monitoramento da raiva, no período de março a dezembro de 2023.

3.2 Objetivos específicos

- Executar o ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, que amplifica a porção *leader* 3' e a região inicial do gene que codifica a Nucleoproteína (N) dos *Lyssavirus*;
- Realizar uma análise comparativa do desempenho diagnóstico entre a IFD, realizada pelo IMA, e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, com ênfase na avaliação da sensibilidade, especificidade diagnóstica e Índice de Concordância de ambos os métodos na detecção do vírus da raiva em amostras de SNC;
- Verificar se o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* possui as qualidades necessárias para ser utilizado como teste confirmatória à IFD.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

O experimento foi conduzido com 149 amostras de *pool* de fragmentos de SNC, incluindo tálamo, córtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal, coletadas de diversas espécies animais (1 sagui, 3 caprinos, 34 equinos e 111 bovinos) que morreram sob suspeita de raiva. As amostras, obtidas entre março e dezembro de 2023, foram enviadas por diferentes municípios de Minas Gerais ao LSA/IMA. O IMA/LSA disponibilizou as amostras utilizadas neste estudo, acompanhadas de dados sobre as espécies envolvidas e informações de georreferenciamento, fundamentais para a realização das análises.

4.2 Procedimentos diagnósticos realizados pelo LSA/IMA

4.2.1 Imunofluorescência Direta

Ao receber as amostras de SNC o LSA/IMA realizou prontamente o teste de IFD, reconhecido como o método padrão-ouro para o diagnóstico da raiva, de acordo com o protocolo descrito a seguir:

- Foram preparadas impressões duplas dos tecidos em lâminas de vidro com extremidades foscas, devidamente identificadas com o número de registro da amostra e os respectivos fragmentos.
- As lâminas foram secas em temperatura ambiente por um período de 15 a 30 minutos.
- As impressões foram fixadas em acetona a -20°C por 30 minutos.
- Após a fixação, as lâminas foram novamente secas em temperatura ambiente.
- As impressões foram tratadas com o conjugado previamente titulado, diluído em cérebro normal (CN) cobrindo toda a área delimitada.
- As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.
- Após a incubação, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS), com pH entre 7,2 e 7,5, e imersas em PBS por 10 minutos.
- Posteriormente, as lâminas foram enxaguadas com água destilada, para evitar a formação de cristais durante a secagem.
- As lâminas foram secas em temperatura ambiente e montadas com glicerina tamponada (pH em 8,5), sendo cobertas com lamínulas.
- A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência com objetiva de imersão. As lâminas controle, positiva e negativa, foram avaliadas primeiro para garantir a especificidade da fluorescência. Somente após a validação dos controles, as amostras diagnósticas foram analisadas.

4.2.2 Inoculação em Camundongo

Após a execução e leitura do teste de IFD, o LSA/IMA procedeu com a prova biológica, utilizando a Inoculação em Camundongo, para as amostras que resultaram negativas no teste inicial, conforme o seguinte procedimento:

- Suspensões a 10% das amostras suspeitas foram preparadas, e 0,03 mL de cada suspensão foram inoculados intracerebralmente em oito camundongos recém-desmamados.
- Os camundongos foram monitorados diariamente ao longo de um período de 30 dias. Durante o período de observação, os sinais clínicos foram sistematicamente registrados em fichas específicas, utilizando-se os seguintes parâmetros: N (normal), A (arrepiado), I (incoordenado), P (paralítico) e M (morto).
- Óbitos ocorridos nas primeiras 48 horas após a inoculação foram atribuídos a traumas ou infecções bacterianas.
- Após o período de observação, amostras de tecido do sistema nervoso de camundongos que desenvolveram paralisia ou morreram após o quinto dia de observação foram submetidas ao teste de IFD.

4.2.3 Encaminhamento de amostras para diagnóstico molecular

Após a realização dos testes de IFD e IC pelo LSA/IMA, as amostras de SNC foram inicialmente armazenadas a -20°C. Posteriormente, essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal (LPVA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram mantidas temporariamente em uma câmara fria a -5°C, até o processamento das amostras. Para o ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, foram analisadas 94 (63%) amostras que apresentaram resultado negativo na IFD, além de 55 (37%) amostras com resultado positivo, a fim de comparar a eficácia dos métodos diagnósticos e validar o desempenho do RT-qPCR como uma ferramenta complementar.

4.3 Processamento das amostras

Para o processamento das amostras, os fragmentos de SNC foram homogeneizados e suspensos em solução salina fosfatada (PBS 1X) a 10% (p/v). A suspensão foi então clarificada por centrifugação a 6.000 x g durante 10 minutos. Em seguida, 140 µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo de microcentrífuga estéril para a extração de RNA. O restante do sobrenadante foi aliquotado e armazenado. Todas as amostras, tanto as destinadas à extração quanto as alíquotas para armazenamento, foram transferidas para um freezer a -80°C, onde permaneceram até o uso posterior.

4.4 Extração de RNA total utilizando kit de extração *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*

A extração de RNA das 149 amostras clínicas de SNC foi realizada utilizando o *Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (*QIAGEN N.V., Hilden,* Alemanha), seguindo rigorosamente o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi imediatamente armazenado a -80°C para garantir sua integridade até o momento da utilização.

4.5 *Primers* e sonda RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus One-step*

Para o ensaio universal de RT-PCR em tempo real LN34 Pan-*Lyssavirus*, utilizou-se um conjunto de *primers* degenerados associados a uma sonda de hidrólise, conforme estabelecido pelo protocolo do ensaio LN34 (quadro 3) (GIGANTE *et al*., 2018; WADHWA *et al*., 2017).

Quadro 3- Sequências dos *primers* e da sonda degenerados usados no ensaio universal Pan-*Lyssavirus* LN34, aplicados na técnica de *One-Step* RT-qPCR.

Primers* e *Probe* (sonda) LN34 Pan-*Lyssavirus				
Primer/Sonda		**Sentido**	**Sequência (5' – 3')**	**[ ]**
1	*Primer* LN34 *Forward* 1	Senso	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA	10 µM
2	*Primer* LN34 *Forward* 2	Senso	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG	10 µM
3	*Primer* LN34 *Reverse*	Antissenso	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	10 µM
4	*Probe* LN34 (sonda)	Senso	(FAM)AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	5 µM

Fonte: Adaptado de Gigante *et al*., 2018.

4.6 Adaptação de protocolo para RT-qPCR Pan-*Lyssavirus* utilizando *Kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step* RT-qPCR

Para realizar o RT-qPCR LN34 Pan-L*yssavirus,* utilizou-se o *SuperScript™ III Platinum™ One-Step RT-qPCR Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA). Entretanto, o protocolo descrito por Gigante *et al*. (2018) e Wadhwa *et al*. (2017) precisou ser adaptado para atender às especificidades deste *kit*, em comparação com o originalmente utilizado. As principais alterações incluem a composição dos reagentes, as condições de reação e os parâmetros de ciclagem.

Todas as reações de RT-qPCR foram preparadas em um fluxo laminar e sob condições estéreis para evitar contaminação. A adaptação do protocolo de acordo com o *kit* determinou que a mistura da reação (*Mix*) fosse composta por 6,5 µL de 2X *Reaction Mix* (*Buffer* 2X), 0,25 µL de *SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix,* 0,25 µL de *ROX™*, 0,75 µL de p*rimer*

Forward 1, 0,75 µL de *primer Forward* 2, 0,75 µL de *primer Reverse*, 0,5 µL de *probe* ou sonda LN34, 0,5 µL de água livre de nucleases, 2,5 µL de RNA extraído (ou controle positivo/negativo). O volume final da reação foi ajustado para 12,5 µL (quadro 4).

Quadro 4 - Preparação da mistura da reação (*Mix*) LN34 para o RT-qPCR.

Reagente		Quantidade (µl)
1	*2X Reaction Mix (Buffer 2 X)*	6,25 µl
2	*RT/Platinum™ Taq Mix* (enzima)	0,25 µl
3	*ROX*™ (diluído 1:10)	0,25 µL
4	*Primer LN34 Forward* 1 10 µM	0,75 µl
5	*Primer LN34 Forward* 2 10 µM	0,75 µl
6	*Primer LN34 Reverse* 10 µM	0,75 µl
7	*Probe* LN34 (sonda) 5 µM	0,5 µl
8	Água DNAse e Rnase *Free*	0,5 µl
9	RNA extraído	2,5 µl
Total por reação		**12,5 µl**

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a adaptação, os parâmetros do programa de ciclagem foram definidos conforme as recomendações específicas do *kit* utilizado para PCR em tempo real, garantindo a eficiência e a precisão da amplificação do RNA (quadro 5).

Quadro 5 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da PCR em tempo real para o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus e* β-actina.

Etapa do programa	Temperatura	Tempo	N° de Ciclos
Transcrição reversa	50ºC	30 minutos	1 ciclo
Inativação da transcriptase reversa/ Desnaturação inicial	95ºC	2 minutos	
Desnaturação	95ºC	15 segundos	45 ciclos
Anelamento/Extensão	56ºC	30 segundos	

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 *Primers* e sonda utilizados para controle endógeno de β-actina

O ensaio *One-Step* RT-qPCR para LN34 Pan-*Lyssavirus* inclui um controle do gene da β-actina. Durante o RT-qPCR para LN34 Pan-*Lyssavirus*, o teste de controle endógeno da β-actina foi conduzido simultaneamente. Este controle é fundamental para detectar a expressão

do gene da β-actina no mRNA do hospedeiro, que é amplamente conservado entre todos os mamíferos. O teste de RT-qPCR focado na β-actina desempenha um papel crucial como monitor da presença de RNA em cada amostra, além de servir como indicador de possíveis problemas, como inibição da amplificação, falhas na extração e/ou degradação do RNA (quadro 6) (GIGANTE *et al*., 2018).

Quadro 6 - Sequências de *primers* e sonda de hidrólise utilizadas na técnica de RT-qPCR para a detecção do gene endógeno da β-actina.

***Primers* e *Probe* (sonda) β-Actina RT- qPCR**				
***Primer*/Sonda**		**Sentido**	**Sequência (5' – 3')**	**[ ]**
1	*Primer* β-Actina *Forward*	Senso	CGATGAAGATCAAGATCATTGC	10 µM
2	*Primer* β-Actina *Reverse*	Antissenso	AAGCATTTGCGGTGGAC	10 µM
3	β-Actina *Probe* (sonda)	Senso	(HEX)-TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG ATC A-(BHQ1)	5 µM

Fonte: Adaptado de Gigante *et al*., 2018.

4.8 Adaptação de protocolo para RT-qPCR para o controle do gene da β-actina

Para realizar o RT-qPCR para o controle endógeno de β-actina, utilizamos o *Kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step* RT-qPCR (*Thermo Fisher Scientific, EUA*). O protocolo descrito por Gigante *et al*. (2018) e Wadhwa *et al*. (2017) foi modificado e adaptado para atender às necessidades específicas deste estudo. As adaptações do protocolo incluíram ajustes nos reagentes, concentrações de p*rimers* e sondas, além de ajustes nos parâmetros de temperatura e tempo de ciclagem para maximizar a eficiência e a sensibilidade do ensaio.

A mistura da reação (*Mix*) foi configurada da seguinte maneira: 6,5 µL de *2X Reaction Mix* (*Buffe*r 2X), 0,25 µL *de SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix*, 0,25 µL de *ROX™*, 0,75 µL de *primer Forward*, 0,75 µL de *primer Reverse*, 0,5 µL de *probe* ou sonda β-Actina, 1,25 µL de água livre de nucleases, e 2,5 µL de RNA extraído (ou controle positivo/negativo). O volume final da reação foi ajustado para 12,5 µL (quadro 7).

Quadro 7- Preparação da mistura da reação (*Mix*) β-actina para o RT-qPCR.

	Reagente	Quantidade (µl)
1	2X *Reaction Mix (Buffer 2 X)*	6,25 µl
2	*RT/Platinum™ Taq Mix* (enzima)	0,25 µl
3	*ROX™* (diluído 1:10),	0,25 µl
4	*Primer* β-Actina *Forward* 10 µM	0,75 µl
5	*Primer* β-Actina *Reverse* 10 µM	0,75 µl
6	β-Actina *Probe* 5 µM	0,5 µl
7	Água DNA e Rnase *Free*	1,25 µl
8	RNA extraído	2,5 µl
Total por reação		**12,5 µl**

Fonte: elaborado pela autora

Os parâmetros do programa de ciclagem, incluindo temperatura e tempo, definidos para o RT-qPCR de controle endógeno de β-actina, são idênticos aos utilizados para o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*. Esses parâmetros podem ser visualizados no Quadro 5.A uniformidade dos parâmetros de ciclagem para ambos os ensaios garante a consistência e a comparabilidade dos resultados, facilitando a análise simultânea e eficiente de múltiplos alvos.

4.9 Procedimentos para realização do RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e β-actina

Os ensaios de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e β-actina foram realizados utilizando uma placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate* de 96 poços (*Applied Biosystems™*). Todo o procedimento foi conduzido sob fluxo laminar estéril para garantir a ausência de contaminação. Em cada poço, foram adicionados 10 µL de *Mix*, preparado conforme detalhado nos Quadros 4 e 7. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Cada placa incluiu controles negativos (água ultra pura) e positivos (amostras previamente confirmadas como positivas por IFD).

Posteriormente, 2,5 µL de RNA foram adicionados em cada poço contendo a mistura de reação. A placa foi selada com *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* (*Applied Biosystems™*) e centrifugada por 15 segundos para garantir a homogeneidade das amostras e remover possíveis bolhas de ar. Em seguida, a placa foi colocada no aparelho *QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)* para a realização do RT-qPCR, seguindo os ciclos de temperatura descritos no Quadro 5. Os resultados foram analisados utilizando o *software QuantStudio™ Design & Analysis Software 1.5.1*

4.10 Interpretação de resultados

As amostras foram classificadas como positivas, negativas ou inconclusivas, com base no número de Ct obtidos nos ensaios LN34 Pan-*Lyssavirus* e β-actina. O protocolo para a determinação do resultado foi seguido através da metodologia descritas por Gigante *et al*. (2018) e Wadhwa *et al*. (2017). Para determinar o resultado, os Ct (*Threshold Cycle* ou Ciclo Limiar) dos ensaios LN34 Pan-*Lyssavirus* e β-actina são analisados em conjunto (quadro 8).

Quadro 8 - Classificação do Ct (*Threshold Cycle*) das amostras analisadas pelo ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus One-Step* RT-qPCR

Resultado	LN34 Ct	β-Actina Ct	Interpretação
Negativo	Não detectado	≤ 33	Ausência de RNA de *Lyssavirus*
Positivo	Ct ≤ 35	Qualquer	RNA de *Lyssavirus* presente
Inconclusivo	35< Ct ≤ 45	Qualquer	Contaminação, inibição, baixa carga viral ou quantidade insuficiente de amostra.
Inconclusivo	Não detectado	>33 ou não detectado	Inibição ou quantidade insuficiente de amostra.

Fonte: Adaptado de Gigante *et al*., 2018.

Após a obtenção das médias de Ct das duplicatas geradas pelo *software* de análise do RT-qPCR, tanto para LN34 quanto para β-actina, os valores médios foram transferidos para uma planilha desenvolvida no *Google Sheets*. Nesta planilha, foi criada uma fórmula específica para analisar conjuntamente os valores de Ct de β-actina e do LN34 Pan-*Lyssavirus*. Essa fórmula gera automaticamente o resultado do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, classificando a amostra testada como negativa, positiva, inconclusiva 1 ou inconclusiva 2.

4.11 Georreferenciamento do diagnóstico da raiva em MG

Os dados referentes ao envio e à quantidade de amostras para o diagnóstico de raiva pelos municípios de Minas Gerais, bem como os resultados positivos nos ensaios de IFD, foram georreferenciados utilizando o *software QGIS* 3.38.0. Foram utilizados arquivos de mapas digitais fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), contendo os limites político-administrativos das mesorregiões e municípios. O processo de georreferenciamento permitiu uma análise descritiva da distribuição espacial das amostras e dos resultados.

4.12 Análises estatísticas

Foi realizada uma análise estatística para avaliar a sensibilidade e especificidade diagnóstica e a concordância entre os testes, utilizando tabelas de contingência de dois por dois e três por dois. Essas tabelas foram elaboradas no *software Excel*, com o teste de IFD estabelecido como padrão-ouro. Esses cálculos permitiram uma avaliação detalhada da performance diagnóstica dos testes laboratoriais executados, comparando-os com o padrão-ouro definido.

4.13 Sensibilidade e especificidade diagnóstica

Para calcular a sensibilidade e a especificidade diagnóstica dos testes laboratoriais (IFD e RT-qPCR Pan-*Lyssavirus*), foi utilizada uma tabela de contingência 3 x 2. Esta tabela considerou a relação entre positividade e negatividade, incluindo valores inconclusivos do RT-qPCR, nas amostras de SNC. As equações matemáticas utilizadas para esse propósito são as seguintes:

4.13.1 Sensibilidade diagnóstica

$$S_{teste} = \frac{P_{teste}}{P_{total}}$$

Onde:

S_{teste} é a sensibilidade diagnóstica de um determinado ensaio laboratorial.

P_{teste} é o número de resultados positivos que se correlacionam entre ambas as provas laboratoriais testadas.

P_{total} é a positividade total detectada no teste padrão-ouro estabelecido.

4.13.2 Especificidade diagnóstica

$$E_{teste} = \frac{N_{teste}}{N_{total}}$$

Onde:

E_{teste} é a especificidade diagnóstica de um determinado ensaio laboratorial.

N_{teste} é o número de resultados negativos que se correlacionam entre ambas as provas laboratoriais testadas.

N_{total} é a negatividade total detectada no teste padrão-ouro estabelecido.

4.14 Índice de concordância

Para avaliar a concordância entre os resultados dos dois ensaios diagnósticos (IFD e RT-qPCR LN34), foi aplicado o coeficiente de *Kappa (κ),* com um intervalo de confiança de 95%. No cálculo deste índice, foram considerados exclusivamente os resultados "positivo" e "negativo", sendo excluídos os valores "inconclusivo". A análise foi conduzida por meio do *software* estatístico *Stata*. A interpretação dos coeficientes de *Kappa*, em relação aos níveis de concordância, seguiu a classificação proposta por Landis e Koch (1977), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Interpretação do coeficiente *Kappa*

Valor do coeficiente *Kappa*	Nível de concordância
< 0	Não existe Concordância
0 – 0,20	Concordância Mínima
0,21 – 0,40	Concordância Razoável
0,41 – 0,60	Concordância Moderada
0,61 – 0,80	Concordância Substancial
0,81 – 1,0	Concordância Perfeita

Fonte: Adaptado de Landis e Koch, 1997.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de sensibilidade e especificidade diagnóstica

Comparado ao teste padrão-ouro para o diagnóstico da raiva, a IFD, o LN34 Pan-*Lyssavirus* apresentou uma sensibilidade diagnóstica de 96,4% e uma especificidade diagnóstica de 78,7%, considerando os resultados inconclusivos nos cálculos (tabela 2).

Tabela 2 - Tabela de contingência para avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica entre a Imunofluorescência Direta (IFD) e o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para detecção RABV em 149 amostras de Sistema Nervoso Central.

		Imunofluorescência Direta (IFD)		
		Positivo	**Negativo**	**Total**
RT-qPCR	**Positivo**	53	11	**64**
	Negativo	0	74	**74**
	Inconclusivo	2	9	**11**
	Total	**55**	**94**	**149**

É importante destacar que, das 149 amostras testadas, o exame padrão-ouro para o diagnóstico da raiva *post mortem*, identificou 55 (37%) amostras como positivas e 94 (63%) como negativas. Entre as 94 amostras negativas pela IFD, 11 foram positivas no RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, apresentando concentrações virais reduzidas, classificadas da seguinte maneira: 5 com carga viral extremamente baixa (valores de Ct entre 31,1 e 35), 5 com carga viral baixa (Ct entre 26,1 e 31) e 1 com carga viral moderada (Ct entre 19,1 e 26), como podemos observar no quadro 9. Os resultados individuais de todas as amostras podem ser observados no Apêndice A.

Quadro 9 - Amostras que apresentaram resultados divergentes entre os ensaios realizados, sendo negativas na IFD, mas positivas no RT-qPCR Pan-*Lyssavirus.*

				RT- qPCR Pan-*Lyssavirus*		
Amostra	**Espécie**	**IFD**	**IC**	**Ct β-actina**	**Ct LN34**	**Resultado**
IMA24/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,751	26,640	Positivo
IMA41/23	Equino	Negativo	Negativo	24,178	27,550	Positivo
IMA54/23	Caprino	Negativo	Negativo	19,434	34,024	Positivo
IMA62/23	Equino	Negativo	Negativo	30,029	24,106	Positivo
IMA95/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,468	33,225	Positivo
IMA101/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,393	33,960	Positivo
IMA105/23	Equino	Negativo	Negativo	23,874	26,138	Positivo
IMA141/23	Equino	Negativo	Negativo	23,988	33,605	Positivo
IMA150/23	Equino	Negativo	Negativo	29,339	31,437	Positivo
IMA172/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,347	30,681	Positivo
IMA193/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,975	27,016	Positivo

IFD: Imunofluorescência Direta; IC: Inoculação em Camundongo; Ct: Limiar de Ciclo; ND: Não detectado

Adicionalmente, após a realização do RT-qPCR em todas as amostras, foi necessário reextrair 19 delas devido a resultados inconclusivos e discordantes em comparação à IFD para β-actina e LN34 Pan-*Lyssavirus*, apontando problemas nos testes realizados. Após a reextração, 11 amostras ainda apresentaram resultados inconclusivos no RT-qPCR. Dessas, 9 foram negativas na IFD e 2 foram positivas na IFD. Essas 11 amostras receberam resultado indeterminado no RT-qPCR, pois não foram detectados valores de Ct tanto para o LN34 quanto para o controle endógeno de β-actina, indicando que as amostras estavam degradadas (quadro 10).

Quadro 10 - Amostras que apresentaram resultados inconclusivos no RT-qPCR LN34, divergindo dos resultados do teste padrão-ouro.

				RT- qPCR Pan-*Lyssavirus*		
Amostra	**Espécie**	**IFD**	**IC**	**Ct β-actina**	**Ct LN34**	**Resultado**
IMA73/23	Bovino	Positivo	Positivo	ND	ND	Inconclusivo
IMA189/23	Bovino	Positivo	Positivo	ND	ND	Inconclusivo
IMA37/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA44/23	Caprino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA57/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA93/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA103/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA155/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA162/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA173/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA200/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo

IFD: Imunofluorescência Direta; IC: Inoculação em Camundongo; Ct: Limiar de Ciclo; ND: Não detectado.

5.2 Nível de concordância

Comparando os resultados entre a IFD e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, o índice de *Kappa*, que avalia o grau de concordância entre os dois testes, foi de 0,838 ± 0,046. Esse valor indica uma concordância quase perfeita. Somente 11 amostras revelaram resultados divergentes entre os dois métodos avaliados. Vale destacar que as amostras com resultados inconclusivos no RT-qPCR foram excluídas do cálculo, que considerou apenas os resultados positivos e negativos (tabela 3 e quadro 9).

Tabela 3 - Tabela de contingência 2 x 2, utilizada para calcular o índice *Kappa* de concordância e avaliar a concordância entre os dois métodos diagnósticos utilizados.

		RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*		
		Positivo	**Negativo**	**Total**
IFD	**Positivo**	53	0	**53**
	Negativo	11	74	**85**
	Total	**64**	**74**	**138**

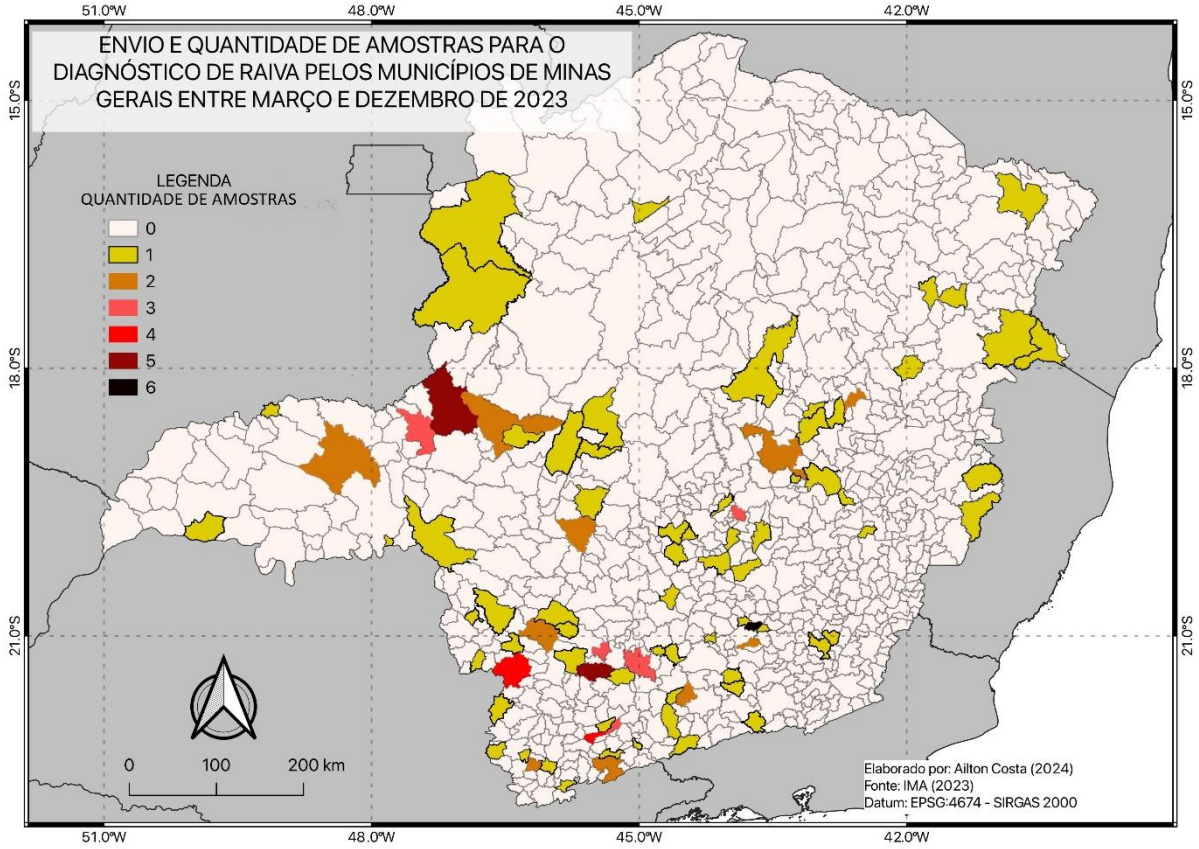
5.3 Análise descritiva

5.3.1 Distribuição espacial das amostras de herbívoros submetidas para diagnóstico da raiva em Minas Gerais

Entre março e dezembro de 2023, apenas 95 (11,14%) dos 853 municípios de Minas Gerais encaminharam materiais ao LSA/IMA para análise diagnóstica da raiva, totalizando 149 amostras. Em contrapartida, a maioria dos municípios (88,86%) não submeteu nenhum material para exame. Nos municípios que participaram, o número de amostras enviadas variou de 1 a 6.

Analisando a distribuição do envio de amostras por município, observa-se que os municípios pertencentes as Regiões Central e Sul do estado se destacam pela maior frequência na submissão de materiais para o diagnóstico. Por outro lado, municípios das Regiões Nordeste Leste demonstram uma participação intermediária nesse processo. Em contraste, as Regiões Noroeste e Norte exibem as menores taxas de envio (figura 7).

Figura 7 - Distribuição geográfica do número de amostras enviadas para diagnóstico da raiva pelos municípios de Minas Gerais entre março e dezembro de 2023.

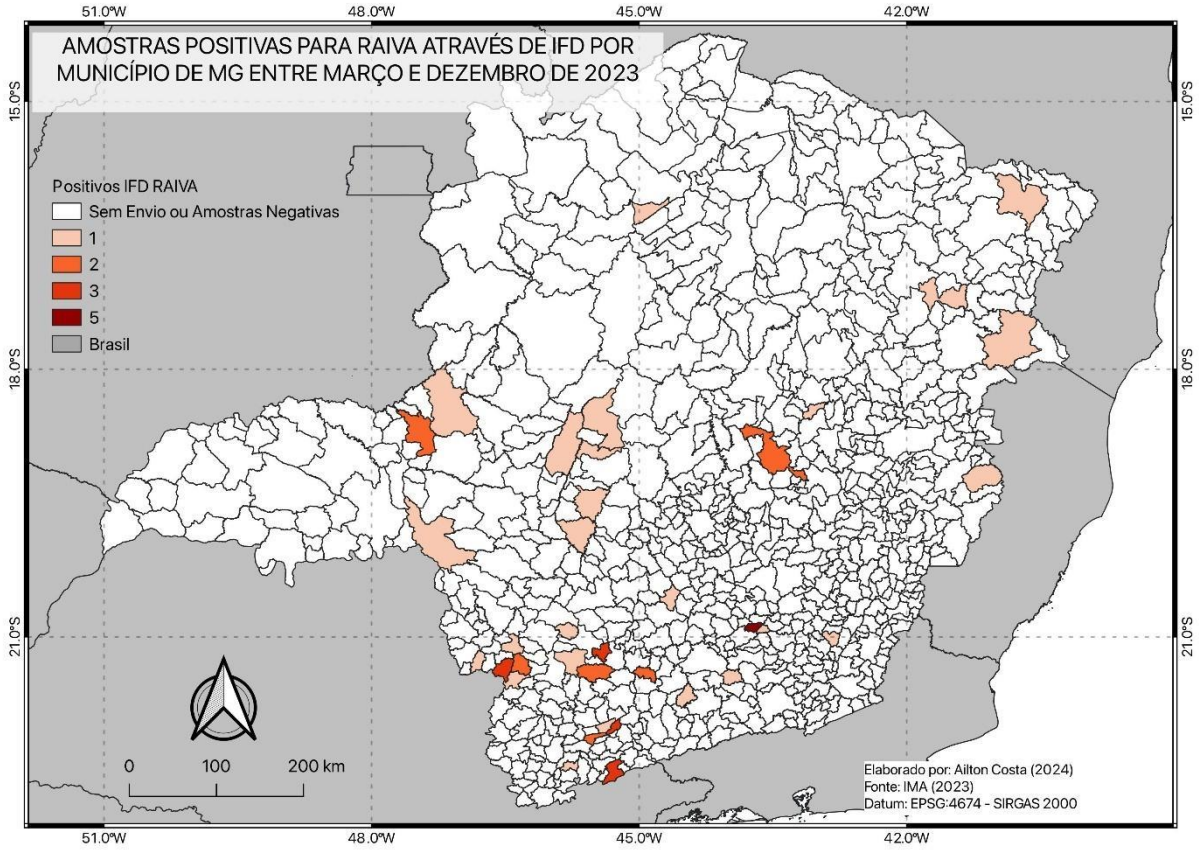


.

5.3.2 Distribuição espacial das amostras positivas na IFD

Em relação à distribuição geográfica da positividade para raiva, detectada por meio da IFD, dos 95 municípios que submeteram amostras para análise, 37 (38,95%) obtiveram resultados positivos, com o número de amostras positivas variando entre 1 e 5 por município. A análise revelou uma maior concentração de casos nas Regiões Sul e Central de Minas Gerais. O município de Caranaíba, situado na Região Central, registrou o maior número de casos positivos, totalizando cinco. Este dado destaca a Região Central tanto pela alta frequência de envio de amostras quanto pela elevada detecção de casos. Adicionalmente, algumas regiões dispersas, como a Oeste, Nordeste e Leste, apresentam um número menor de casos positivos. Na Região Norte de Minas, foi identificado um único caso positivo, enquanto a Região Noroeste não apresentou nenhum caso de positividade durante o período analisado (figura 8).

Figura 8 - Distribuição geográfica das amostras positivas para raiva diagnosticadas por IFD nos municípios de Minas Gerais, de março a dezembro de 2023.



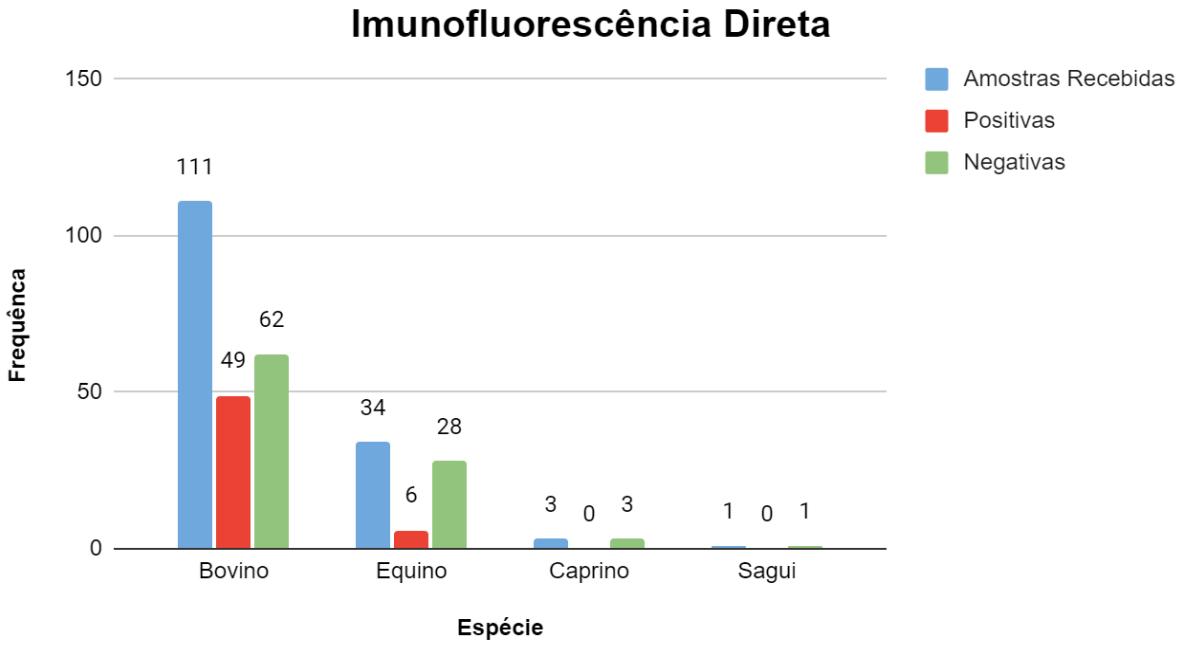
5.3.3 Classificação das amostras de acordo com a espécie

Foram analisadas 149 amostras de animais com suspeita de raiva, utilizando as técnicas de IFD, IC e RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*. Entre os animais, havia 111 amostras de bovinos (74,5%), 34 de equinos (22,82%), 3 de caprinos (2,01%) e 1 de sagui (0,67%).

5.3.3.1 Análise de amostras por espécie utilizando IFD

De acordo com os resultados da prova padrão-ouro, foram analisadas 149 amostras, das quais 94 (63%) resultaram negativas e 55 (37%) positivas para o vírus da raiva. Na análise das amostras por espécie, entre os bovinos, das 111 amostras avaliadas, 49 (44,1%) foram positivas e 62 (55,9%) resultaram negativas. Para os equinos, das 34 amostras submetidas à análise, 6 (17,7%) foram positivas, enquanto 28 (82,3%) foram negativas. No caso dos caprinos, todas as 3 amostras analisadas apresentaram resultado negativo (100%). A única amostra de sagui testada também foi negativa para o vírus da raiva (100%). Dentre as 55 amostras que testaram positivo para o vírus da raiva, 49 (89,1%) foram de bovinos e 6 (10,9%) de equinos (gráfico 1).

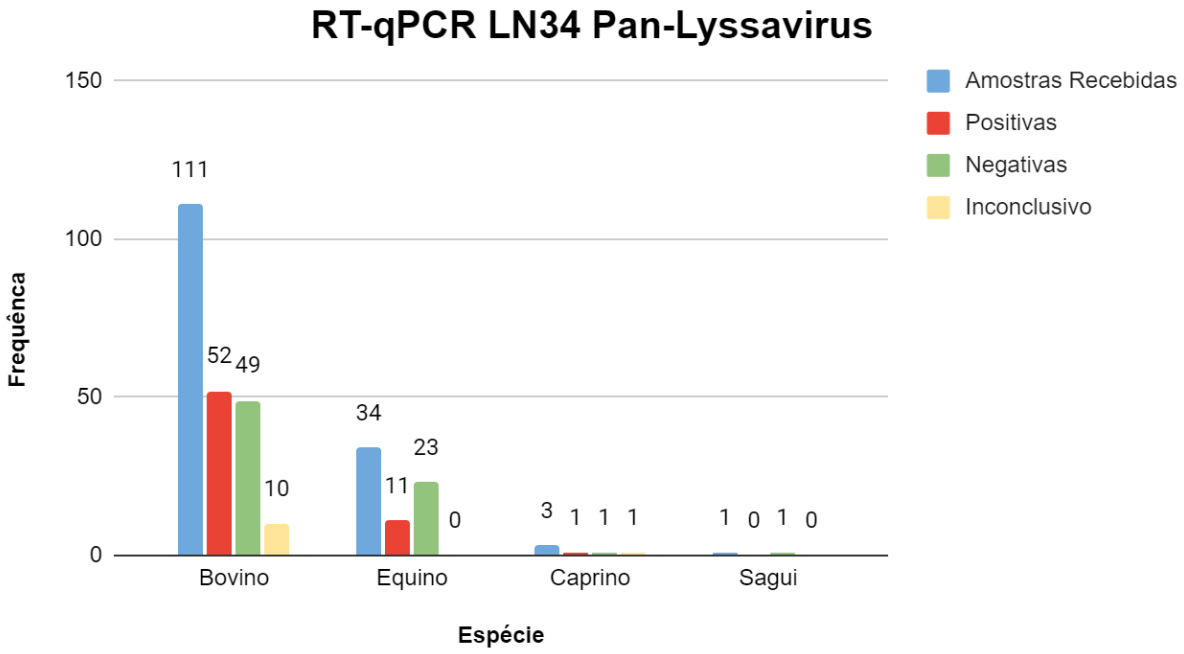
Gráfico 1 - Distribuição das amostras por espécie em Minas Gerais durante o período de março a dezembro de 2023 obtidas através da IFD: totais de amostras positivas e negativas.



5.3.3.2 Análise de amostras por espécie utilizando RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*

As 149 amostras também foram submetidas ao RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, revelando que 74 amostras (49,7%) foram negativas, 11 (7,4%) foram classificadas como inconclusivas, e 64 (42,9%) resultaram positivas para o vírus da raiva. Ao analisar as amostras por espécie, entre os bovinos, das 111 amostras testadas, 52 (46,8%) foram positivas, 10 (9%) inconclusivas, e 49 (44,2%) negativas. Para os equinos, das 34 amostras analisadas, 11 (32,4%) foram positivas, enquanto 23 (67,6%) foram negativas. Entre os caprinos, das 3 amostras analisadas, 1 foi positiva (33,3%), 1 foi inconclusiva (33,3%) e 1 foi negativa (33,3%). A única amostra de sagui testada resultou negativa para o vírus da raiva. Ao observar a distribuição dos 64 casos positivos entre as espécies, verifica-se que os bovinos representaram a maior parte dos casos, com 52 amostras positivas, correspondendo a 81,3% do total. Os equinos apresentaram 11 amostras positivas (17,2%), enquanto os caprinos registraram apenas 1 caso positivo, o que representa 1,6% do total de amostras positivas (gráfico 2).

Gráfico 2 - Número de amostras de SNC recebidas e respectivos resultados (positivos, negativos e inconclusivos) para raiva, por espécie, utilizando o método RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus.*



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 Comparação das taxas de positividade entre RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e IFD

Ao comparar os resultados do RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* com os da IFD, observou-se uma variação nas taxas de positividade. No RT-qPCR, das 149 amostras analisadas, 64 (42,9%) foram positivas para o vírus, enquanto na prova padrão-ouro, esse número foi de 55 (37%). Especificamente para os bovinos, o RT-qPCR detectou 52 amostras positivas (46,8%) das 111 analisadas, comparado com 49 (44,1%) detectadas pela prova padrão-ouro. Para os equinos, o RT-qPCR identificou 11 amostras positivas (32,4%) das 34 analisadas, enquanto a prova padrão-ouro identificou 6 (17,7%). No caso dos caprinos, uma amostra foi positiva no RT-qPCR, mas todas foram negativas na prova padrão-ouro. A única amostra de sagui foi negativa em ambos os testes.

6 DISCUSSÃO

6.1 Comparação do desempenho dos métodos diagnósticos RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e IFD na detecção do RABV

Este estudo demonstrou uma concordância quase perfeita entre os resultados obtidos pelo ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* e o método de Imunofluorescência Direta, indicando alta consistência de ambos os métodos na detecção do RABV em amostras do SNC.

Adicionalmente, a eficácia e a sensibilidade diagnóstica do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no diagnóstico da raiva, em comparação com o teste padrão-ouro, estão amplamente respaldadas na literatura. Estudos recentes, como o de Gigante *et al*. (2018), apresentaram resultados promissores, destacando a alta sensibilidade diagnóstica (99,9%) e especificidade (99,7%) do ensaio LN34, além da capacidade de detectar RNA viral em diversas condições de amostras, incluindo tecidos frescos, congelados e deteriorados. No presente experimento, houve declínio da sensibilidade e especificidade diagnóstica do ensaio RT-qPCR LN34, a sensibilidade foi de 96,4%, enquanto a especificidade foi de 78,7%. A menor especificidade observada pode ser atribuída a dois fatores principais: o primeiro é a maior sensibilidade do RT-qPCR LN34 em relação à IFD, o que resultou em um número significativo de amostras com resultados discordantes. Das 149 amostras analisadas, a IFD identificou 55 como positivas e 94 como negativas. Contudo, entre as 94 amostras negativas pela IFD, 11 foram detectadas como positivas pelo ensaio RT-qPCR LN34, com cargas virais variando de muito baixas a moderadas. Isso sugere que o RT-qPCR LN34 é capaz de detectar o vírus mesmo em amostras com baixíssima carga viral, representando uma vantagem significativa em relação à IFD.

Estudos prévios, como o de Gigante *et al*. (2018), já evidenciaram que o ensaio RT-qPCR LN34 pode identificar RNA viral em amostras com cargas virais muito baixas, o que a IFD, devido à dependência da qualidade dos anticorpos conjugados e da habilidade técnica para diferenciar fluorescência específica de não específica, pode não conseguir detectar. Portanto, as discrepâncias entre os testes podem ser atribuídas à capacidade do RT-qPCR LN34 de identificar quantidades mínimas de RNA viral que permanecem indetectáveis pela IFD, resultando na classificação de amostras negativas pela IFD como positivas no RT-qPCR.

Entretanto, para garantir a precisão dos resultados obtidos, é fundamental considerar as condições experimentais sob as quais os ensaios de IFD e RT-qPCR foram conduzidos nesta pesquisa. As 149 amostras de SNC foram submetidas aos testes em momentos distintos, o que pode ter influenciado os resultados.

Inicialmente, o IMA/LSA conduziu a IFD imediatamente após o recebimento das amostras, assegurando uma rápida análise. Após a realização do teste, as amostras foram armazenadas a -20°C para garantir sua preservação. Posteriormente, 88 dessas amostras foram transferidas para o Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram mantidas em câmara fria a -5°C por aproximadamente 30 dias até serem processadas. Após esse período, a extração do material genético foi realizada, seguida de uma amplificação bem-sucedida por RT-qPCR. Os resultados consistentes tanto para o controle de

β-actina quanto para o ensaio LN34 indicaram a preservação da integridade do RNA e a eficiência dos protocolos laboratoriais aplicados.

Por outro lado, um segundo grupo de 61 amostras foi encaminhado ao LPVA em um momento posterior, enfrentando um percurso distinto. Inicialmente, essas amostras foram armazenadas pelo IMA/LSA a -20°C por um período prolongado antes de serem transferidas para o LPVA. Ao chegarem ao LPVA, foram armazenadas em câmara fria a -5°C por cerca de dois meses. Após a extração do RNA, essas amostras foram congeladas a -80°C por três meses antes da realização do RT-qPCR. Um número significativo de resultados inconclusivos foi observado nessa etapa, possivelmente devido à degradação do RNA, mesmo com o armazenamento em temperaturas controladas. Como consequência, foi necessária a reextração de RNA em 19 amostras, contudo 11 delas continuaram apresentando resultados inconclusivos, sendo que 9 foram negativas na IFD e 2 positivas.

Esse cenário também contribuiu para a diminuição da especificidade do ensaio, pois, assim como no estudo de Gigante *et al*. (2018), os valores de sensibilidade e especificidade foram calculados de maneira conservadora devido à inclusão de resultados inconclusivos na análise estatística. No entanto, diferentemente do nosso estudo, Gigante *et al*. (2018) relataram que diversas amostras falharam na amplificação do controle interno de β-actina ou apresentaram valores de Ct superiores ao ponto de corte de 33. Esses resultados indicaram problemas técnicos como extração ineficiente do RNA, inibição da PCR, degradação do RNA ou quantidade insuficiente de amostra. Após a reextração do RNA, essas amostras obtiveram resultados positivos para β-actina, sugerindo que as dificuldades iniciais estavam relacionadas principalmente à eficiência do processo de extração. Esse achado destaca a importância crítica de um protocolo robusto de extração de RNA para garantir a integridade do material genético e a confiabilidade dos resultados de amplificação.

De acordo com Fabre *et al*. (2014), o armazenamento adequado das amostras de RNA é essencial para evitar sua degradação, sendo comum a conservação em temperaturas de -20°C ou -80°C. No entanto, mesmo em baixas temperaturas, o RNA pode manter certa reatividade. Foi demonstrado que ribonucleases permanecem ativas em RNA congelado a -20°C, e a atividade de certas ribozimas pode ser significativa até a -70°C, podendo até ser aumentada pelo congelamento. Estudos adicionais, como o de Sakai *et al*. (2015), corroboram a influência do tempo e das condições de armazenamento na integridade do RNA viral. Eles destacaram que, para RNA viral do RABV armazenado em cartões de papel de filtro (FTA ®) a -80°C, a estabilidade é mantida por até três meses, com degradação significativa após esse período. Além

disso, Chheda *et al*. (2023) relataram que a estabilidade do RNA é afetada não apenas pela temperatura, mas também pela concentração de RNA e o pH do meio de armazenamento.

No contexto do nosso estudo, a manutenção das amostras a -20°C antes de sua transferência para o LPVA, seguida pelo armazenamento em câmara fria a -5°C, enfatiza a importância das condições de armazenamento na preservação do RNA. Embora o armazenamento a -20°C seja adequado para curtos períodos, essa temperatura pode não ser suficiente para a preservação prolongada, uma vez que a degradação do RNA pode ocorrer em taxas mais lentas, mas ainda significativas. O armazenamento subsequente a -5°C não é ideal para a conservação a longo prazo de RNA, sendo mais adequado o uso de temperaturas abaixo de -20°C, como -80°C, para minimizar a atividade de RNases e a degradação química. No entanto, mesmo o armazenamento a -80°C por períodos superiores a três meses pode resultar em degradação significativa do RNA, reforçando a necessidade de processamento rápido após o recebimento das amostras no laboratório (CHHEDA *et al*., 2023; FABRE *et al*., 2014; SAKAI *et al*., 2015).

Portanto, nossa experiência reforça a necessidade de práticas rigorosas no manejo de amostras, incluindo armazenamento a temperaturas ultrabaixas e processamento ágil, para assegurar a confiabilidade e a precisão dos resultados de diagnóstico molecular. A manutenção adequada das condições de armazenamento é crucial para mitigar a degradação do RNA e garantir a integridade das amostras ao longo do processo analítico.

A baixa especificidade observada pode ter sido influenciada pelos resultados inconclusivos, decorrentes de variações nas condições de temperatura e armazenamento prolongado, resultando na degradação do RNA viral. Esses fatores podem ter contribuído para o aumento de amostras discordantes. Apesar dessas limitações, o ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* demonstrou alta sensibilidade e utilidade como teste confirmatório no diagnóstico da raiva, especialmente em casos com baixa carga viral.

6.2 Distribuição espacial das amostras submetidas para diagnóstico

Dos 853 municípios do estado de Minas Gerais, apenas 95 (11,14%) encaminharam amostras de SNC para o diagnóstico da raiva entre março e dezembro de 2023, totalizando 149 exemplares. As regiões de Minas Gerais que mais encaminharam amostras para diagnóstico da raiva no presente estudo foram as Regiões Sul e Central, refletindo maior participação no envio de materiais. Em contrapartida, as Regiões Noroeste e Norte submeteram o menor número de amostras, sugerindo uma possível limitação em infraestrutura, recursos ou conscientização em

relação à vigilância epidemiológica nessas áreas. Esse padrão de envio pode influenciar diretamente na detecção de casos positivos e na resposta às ações de controle da doença.

Um levantamento anterior realizado por Oviedo-Pastrana et al. (2015) revelou uma participação significativamente maior dos municípios no envio de amostras para o diagnóstico da raiva em Minas Gerais, com 75,2% dos municípios tendo enviado amostras durante um período de 12 anos (2001 a 2012). No entanto, ao dividir o período de estudo em dois intervalos (2001 a 2006 e 2007 a 2012), os autores observaram um declínio no envio de amostras e na detecção de diagnósticos positivos nos últimos seis anos de pesquisa.

Embora o declínio observado por Oviedo-Pastrana et al. (2015) tenha sido significativo, é importante destacar que não é possível realizar uma comparação direta entre os dois estudos, devido à lacuna de 11 anos entre 2012 e 2023, período no qual não houve levantamentos contínuos que permitissem monitorar a tendência no envio de amostras ou no número de diagnósticos positivos de raiva. Sem dados consistentes sobre o comportamento de envio de amostras durante esse intervalo, não é possível afirmar com segurança se a redução observada no presente estudo representa uma continuação da tendência de queda identificada por Oviedo-Pastrana et al. (2015) ou se houve flutuações no número de casos e no envio de amostras ao longo desse período. Portanto, é necessário um monitoramento mais regular e abrangente para avaliar com precisão as tendências epidemiológicas da raiva em Minas Gerais e o impacto das práticas de vigilância e envio de amostras no controle da doença.

6.3 Distribuição regional dos casos positivos

A análise da distribuição geográfica da positividade para raiva em Minas Gerais revelou uma maior concentração de casos nas Regiões Sul e Central, seguidas pelas Regiões Oeste, Nordeste e Leste, enquanto as Regiões Norte e Noroeste apresentaram o menor número de registros. Essa disparidade geográfica parece estar fortemente relacionada à variação no número de amostras enviadas para análise em cada região. Regiões com maior envio de amostras tendem a apresentar uma maior frequência de detecção de casos positivos, o que pode estar relacionado a uma infraestrutura mais robusta, maior disponibilidade de recursos para coleta, e uma maior conscientização local sobre a importância da vigilância epidemiológica.

Embora as Regiões Sul e Central tenham apresentado um maior número de casos positivos, é importante ressaltar que o número total de amostras enviadas ainda não foi expressivo o suficiente para garantir que não haja subnotificação. Mesmo em regiões com um maior envio de amostras, como essas, a quantidade de material coletado não foi grande o bastante para descartar a possibilidade de casos não reportados. A relação entre maior envio de amostras e maior detecção de casos positivos sugere que a vigilância é mais eficiente nessas regiões, mas

a subnotificação ainda pode ocorrer, especialmente em áreas onde o número de amostras submetidas continua limitado em relação à população animal.

Por outro lado, o baixo número de casos observados nas Regiões Norte e Noroeste pode refletir desafios significativos nessas áreas, como infraestrutura limitada, escassez de recursos e menor conscientização sobre a importância da vigilância epidemiológica. Esses fatores podem resultar em subnotificação e detecção tardia da doença, comprometendo a eficácia das estratégias de controle e prevenção da raiva nessas regiões. A capacidade reduzida de vigilância pode mascarar a verdadeira presença da raiva, criando uma falsa percepção de segurança, enquanto a doença pode estar circulando sem ser adequadamente detectada.

Portanto, embora as regiões com maior envio de amostras apresentem mais casos positivos, ainda há uma possibilidade de subnotificação em todo o estado, o que destaca a necessidade de fortalecer a vigilância epidemiológica, melhorar a infraestrutura e aumentar o envio de amostras, para garantir uma detecção mais precisa e abrangente da raiva em Minas Gerais.

6.4 Disparidade no envio e positividade das amostras por espécie

Houve uma discrepância notável no número de amostras enviadas por espécie no presente estudo. Bovinos representaram a maioria das amostras (111/149, ou 74,5%), enquanto equinos tiveram uma participação menor (34/149, ou 22,8%). Caprinos, por outro lado, representaram uma porcentagem ainda mais baixa (3/149, ou 2%). Embora o IMA se concentre principalmente no controle da raiva em animais de produção, ocasionalmente recebe amostras de animais silvestres para diagnóstico, como a amostra de sagui incluída neste estudo (1/149, ou 0,7%). Consequentemente, os resultados positivos dos ensaios diagnósticos entre as diferentes espécies apresentaram variações em todos os testes analisados. Os bovinos apresentaram o maior número de resultados positivos, seguidos pelos equinos e, finalmente, pelos caprinos. Um levantamento conduzido por Ferreira (2007) revelou que, entre 2002 e 2006, o IMA recebeu 3.592 amostras de herbívoros (bovinos e equinos) para diagnóstico de raiva. Destas, 3.184 eram de bovinos (88,65%) e 408 de equinos (11,35%). No total, 1.412 amostras foram positivas, sendo 1.289 de bovinos (91,33%) e 123 de equinos (8,67%). Esses dados reforçam a maior representatividade de amostras de bovinos no diagnóstico da raiva, fato que pode ser atribuído à maior população de bovinos em relação aos equinos e outros animais de produção em Minas Gerais (IBGE, 2021), à percepção de risco pelos proprietários e às estratégias de vigilância implementadas. Além disso, os bovinos, devido à sua presença predominante em áreas rurais e aos métodos de manejo, têm maior probabilidade de contato

com os principais vetores da raiva, como o *D. rotundus*. Esses herbívoros são cruciais como sentinelas na detecção da doença, indicando a circulação da variante AgV3 em regiões específicas. Esta variante, compatível com a isolada em *D. rotundus*, é relevante para a saúde pública, dado os recentes casos de transmissão secundária em cães, gatos e humanos atribuídos ao contato com morcegos vampiros (CENTOAMORE, 2017). Sendo assim, a combinação desses fatores resulta em uma maior submissão de amostras de bovinos para diagnóstico, refletindo a importância dessa espécie no contexto epidemiológico da raiva.

7 CONCLUSÃO

O ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* mostrou-se altamente promissor como método confirmatório da Imunofluorescência Direta, devido à sua elevada sensibilidade diagnóstica e à capacidade de detectar o RABV em diversos tipos de amostras, incluindo aquelas com baixa carga viral. Além disso, sua rapidez de execução contribui para a detecção mais eficiente da doença. No entanto, para assegurar a precisão dos resultados, é crucial que as amostras sejam manuseadas de forma adequada, com armazenamento em temperaturas ultrabaixas e processamento imediato, minimizando o risco de degradação do material genético.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. D. de F. *et al.* Risco de transmissão do vírus da raiva oriundo de sagui (*Callithrix jacchus*), domiciliado e semidomiciliado, para o homem na região metropolitana de Fortaleza, estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 356-363, maio 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000031. Acesso em: 24/05/2024.

ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Rabies virus transcription and replication. In: UPR 3296 CNRS, Virologie Moléculaire et Structurale, Gif sur Yvette, France; UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, Unit of Virus Host Cell Interactions, Grenoble, France. **Rabies virus transcription and replication**. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00001-9>. Acesso em: 24/05/2024.

ALMEIDA, G.L. de; CARGNELUTTI, J.F.; RIES, A.S.; et al. Sequence analysis of nucleoprotein gene reveals the co-circulation of lineages and sublineages of rabies virus in herbivorous in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 837–846, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s42770-020-00226-z>. Acesso em: 07/08/2024.

ARECHIGA CEBALLOS, N. *et al.* Novel *Lyssavirus* in bat, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 793-795, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1905.121071>. PubMed Central PMCID: PMC3647500. pmid:23648051. Acesso em: 13/04/2024.

ATANASIU, P. Quantitative assay and potency test of anti-rabies serum. In: **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: World Health Organization, pp. 415-426.

BAER, G. M. The history of rabies. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies.** 2. ed. **San Diego: Academic Press**, 2007. p. 1-22. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/B978-012369366-2/50003-8>. Acesso em: 07/05/2024.

BANYARD, A. C.; EVANS, J. S.; EMERSON, S.; FOOKS, A. R. *et al.* Bats and *Lyssavirus*es. In: **Advances in Virus Research.** [s.l.]: **Elsevier**, p. 239-289, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387040-7.00012-3>. Acesso em: 07/06/2024.

BARTAQUINI, R. T. et al. Evaluation of polyclonal anti-RNP IgG antibody for rabies diagnosis by indirect rapid immunohistochemistry test. **Acta Tropica**, v. 105340, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105340>. Acesso em: 03/07/2024.

BASSUINO, D. M. *et al.* Negri bodies in the central nervous system of cattle and horses with natural rabies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 2, p. 166-170, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638716647992>. Acesso em 05/05/2024.

BOURHY, H.; ROLLIN, P. E.; VINCENT, J.; SUREAU, P. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 519-523, mar. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.27.3.519-523.1989>. Acesso em: 21/04/2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009**. 2. ed. Brasília: **Mapa/ACS**, 2009. 124 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/MANUAL_RAIVAHERBVOROS2009.pdf>. Acesso em: 23/04/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no município de Portel-Pará, Março/Abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico (Brasília)**, v. 4, p. 2-5, 2004. Disponível em: <https://patuaback.iec.gov.br/server/api/core/bitstreams/29d3eda3-a884-4667-8d2f-e3338f778944/content>. Acesso em: 02/02/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2008. 108 p. Disponível em: https:<//www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/raiva/manual-de-diagnostico-laboratorial-da-raiva.pdf/view>. Acesso em: 03/07/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Normas técnicas da profilaxia da raiva humana**, 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/raiva/normas-tecnicas-da-profilaxia-da-raiva-humana.pdf>. Acesso em: 04/06/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses**. 1. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2016. 121 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/zoonose/manual-zoonoses-normas-2v-7julho16-site.pdf/view>. Acesso em: 09/04/2024

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2022. **Raiva dos herbívoros e EEB**. Disponível em:< https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-e-eeb/raiva>. Acesso em: 04/06/2024.

BRAVO, T. C. Investigación documental de la *Primer*a epidemia de rabia registrada en la República Mexicana en 1709. **Epoca**, v. 20, n. 6, p. 705-716, 1978.

BRONNERT, J. *et al*. Organ transplantations and rabies transmission. **Journal of Travel Medicine**, v. 14, n. 3, p. 177-180, maio/jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2006.00095.x>. Acesso em: 07/06/2024.

BOURHY, H. *et al.* Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2419-2426, set. 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265516/pdf/jcm00033-0217.pdf>. Acesso em: 07/06/2024.

CARINI, A. Sur une grande épizootie de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 25, p. 843-846, 191

CASTILHO, J. G.; MACHADO, L. F.; CARNIELI, P. J. R.; FAVORETTO, S. R. Método de diagnóstico antemortem da raiva humana por meio de técnicas de biologia molecular utilizando saliva, e biópsia de pele da região da nuca. **BEPA**, v. 10, n. 112, p. 1-9, 2013. Disponível em:< https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/38310/36141>. Acesso em: 01/06/2024.

CENTOAMORE, N. H. F. *et al.* Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 283, p. 113918, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113918>. Acesso em: 09/04/2024.

CENTOAMORE, N. H. F. **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos.** 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em:< https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-21062017-154618/publico/NATALIA_HELENA_FRADA_CENTOAMORE_ORIGINAL.pdf>. Acesso em: 09/04/2024.

CEPANZO. **Monography em Es**. Martinez: **Centro Panamericano de Zoonosis**, 1989. 51 p. LILACS, ID: lil-367603. Biblioteca responsável: US1.1. Localização: US1.1; PAHO COLL/CEPANZO/NSP/89-01.

CHHEDA, U. *et al.* Factors affecting stability of RNA – temperature, length, concentration, pH, and buffering species. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 113, p. 377-385, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.11.023>. Acesso em: 11/04/2024.

CHIARATO, M. E. R. **Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a detecção do vírus da raiva no Brasil**. 2021. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em:< https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-17082021-080342/publico/Maria_Eduarda_Rodrigues_Chierato_original.pdf>. Acesso em: 14/02/2024

CHIERATO, M. E. R. *et al.* Evaluation of LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay for rabies diagnosis in Brazil. **Journal of Virological Methods**, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil; Instituto Pasteur de Sao Paulo. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.114948>. Acesso em: 14/02/2024

CHIENWICHAI, P.; REAMTONG, O. Application of multi-omics technologies to decipher rabies pathogenesis. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, n. 2, art. 1, 2020. Disponível em:< https://doi.org/10.56808/2985-1130.3010>. Acesso em: 23/06/2024.

DACHEUX, L. *et al.* A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 11, p. 1410-1417, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/592969>. Acesso em: 03/05/2024.

DA ROSA, E. S. T. *et al.* Bat-transmitted Human Rabies Outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1197-1202, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/1208.050929>. Acesso em: 08/06/2024.

DAVIS, B. M.; RALL, G. F.; SCHNELL, M. J. Everything you always wanted to know about rabies virus (but were afraid to ask). **Annual Review of Virology**, v. 2, p. 451-471, nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055157>. Acesso em: 06/06/2024.

DEAN, D. J.; ABLESETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. 4th ed. Geneva: WHO, 1996. p. 88-96.

DIAS, R. A.; BARRAVIERA, B.; BENASSI, M. S. Risk model to assess livestock rabies exposure in the state of São Paulo, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 30, p. 370-376, 2011. pmid:22124696.

FABRE, A. L.; COLOTTE, M.; LUIS, A. *et al*. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. **Eur J Hum Genet**, v. 22, p. 379–385, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.145. Acesso em: 02/06/2023.

FAUQUET, C. M. *et al.* Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. 8. ed. [s.l.]: **Elsevier Academic Press**, 2005. v. 8.

FERREIRA, R. DE S. **Levantamento Epidemiológico Da Raiva No Estado De Minas Gerais No Período De 2002 a 2006**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Alfenas, 2007. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNFE_a6fb3c3ad690d1e5e627b32cfabf6cf0>. Acesso em: 04/09/2023.

FENNER, F. *et al.* Veterinary Virology**.** Zaragoza: **Ed. Acribia**, 1992

FOOKS, A. R. *et al.* Current status of rabies and prospects for elimination. **The Lancet,** London, v. 384, n. 9951, p. 1389-1399, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5>. Acesso em: 15/04/2024.

FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. **Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management**. 4th ed. **San Diego: Academic Press**, 2020. ISBN 9780128187050. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201791>. Acesso em: 11/12/2023.

FOOKS, A. R.; JOHNSON, N.; FREULING, C. M.; WEI, C. Y.; VOS, A. Rabies. **Nature Reviews Disease *Primer*s**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>. Acesso em: 21/01/2024.

GARBINO, G. S. T. *et al*. **Updated checklist of Brazilian bats: versão 2020.** Comitê da Lista de Morcegos do Brasil (CLMB), Sociedade Brasileira para o Estudo de Quirópteros (SBEQ), **2020**. Disponível em: <https://www.sbeq.net/lista-de-especies>. Acesso em: 20/04/2024.

GERMANO, P. M. L. *et al.* Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 1, p. 133, 15 mar. 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v14i1p133-141>. Acesso em: 13/04/2024.

GIGANTE, C. M. *et al.* Multi-site evaluation of the LN34 Pan-*Lyssavirus* real-time RT-PCR assay for post-mortem rabies diagnostics. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197074>. Acesso em: 08/03/2023.

GUNAWARDENA, P. S.; MARSTON, D. A.; ELLIS, R. J.; WISE, E. L.; KARAWITA, A. C.; BREED, A. C. *et al. Lyssavirus* in Indian Flying Foxes, Sri Lanka. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 8, p. 1456-1459, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2208.151986>. Acesso em: 09/04/2024.

GUICHARD, P. *et al.* Three-dimensional morphology of rabies virus studied by cryo-electron tomography. **Journal of Structural Biology**, v. 176, n. 1, p. 32-40, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.07.003>. Acesso em: 23/02/2024.

HALLIDAY, J. *et al.* Reunindo a vigilância de zoonoses emergentes e endêmicas: desafios compartilhados e uma solução comum. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, p. 2872-2880, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0362>. Acesso em: 02/04/2024.

HAMPSON, K.; COUDEVILLE, L.; LEMBO, T.; SAMBO, M.; KANINGA, M. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003709, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003786.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RIACHANAKUL, J. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 6, p. 354-365, 2002. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/s1474-4422(02)00041-8>. Acesso em: 26/05/2024.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, v. 81, n. 2-3, 2021. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=720>. Acesso em: 01/03/2024.

ICTV. Genus: *Lyssavirus*. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2022. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/rhabdoviridae/rhabdoviridae/*Lyssavirus*>. Acesso em: 02/02/2024.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2021 Release**. **International Committee on Taxonomy of Viruses**, 2021.

ITO, M.; ITOU, T.; SHOJI, Y.; SAKAI, T.; ITO, F.H.; ARAI, Y.T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 23, n. 1-2, p. 119-131, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00048-3. Acesso em: 07/08/2024

JACKSON, A. C. Current and future approaches to the therapy of human rabies. **Antiviral Research**, v. 99, n. 1, p. 61-67, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.01.003>. Acesso em: 04/02/2024.

JOHNSON, N. *et al.* Human rabies due to *Lyssavirus* infection of bat origin. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 151-159, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.001>. Acesso em: 03/04/2024.

KOPROWSKI, H. T. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: **World Health Organization**, 1996. p. 80-87. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/38286>. Acesso em: 02/03/2024.

KOTAIT, I. *et al.* Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p. 2-8, 2007. Disponível em: <http://ses.sp.bvs.br/lildbi-textos/docsonline/get.php?id=1067>. Acesso em: 03/03/2024.

KOTAIT, I. *et al.* Non-human primates as a reservoir for rabies virus in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 1, p. 47-59, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/zph.12527>. Acesso em: 03/02/2024.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKOAKA, N. Y. **Raiva – Aspectos gerais e clínica**. Manual Técnico do Instituto Pasteur, n. 8. São Paulo: **Instituto Pasteur**, 2009. Disponível em:< http://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2009/ses-18933/ses-18933-2298.pdf>. Acesso em: 03/02/2024.

KUZMIN, I. V. Virus Isolation in Animals. In: RUPPRECHT, C.; NAGARAJAN, T. (Eds.). **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2**. [s.l.]: **Elsevier**, 2015. v. 2, p. 13-23. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/310836/9789241515153-eng.pdf>. Acesso em: 05/04/2024.

LAFON, M.; WIKTOR, T. J. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. **The Journal of General Virology**, v. 66, p. 2125-2133, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2125>. Acesso em: 06/02/2024.

LAMAR UNIVERSITY. Jungle critters: vampire bat. 2012. Disponível em: <https://www.lamar.edu/arts-sciences/biology/study-abroad-belize/jungle-critters/jungle-critters-2/vampire-bat.html>. Acesso em: 01/08/2024.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–74, mar. 1977.

LOPES, M. C. **Comparação entre as técnicas de RT-PCR e inoculação intracerebral em camundongos para detecção do vírus da raiva em amostras mantidas por longos períodos em diferentes estados de conservação**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2008. Disponível em: <http://www2.fmva.unesp.br/Home/pos-graduacao/mestrado-doutorado/marissol-cardoso-lopes-me.pdf>. Acesso em: 04/04/2024.

MACIEL, R. R. H. **Ocorrência, ciclicidade e evolução de focos de raiva dos herbívoros na região de grande Florianópolis e os morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (*Chiroptera, Phyllostomidae*)**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Lages – SC, 2000. Disponível em: <https://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanitariaanimal/files/2012/08/Artigo_Regis1.pdf>. Acesso em: 05/07/2024.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's Veterinary Virology**. 5th ed. [s.l.]: **Elsevier**, 2010. ISBN 9780128009468. eBook ISBN 9780128011706.

MANNING, S. E. *et al*. Human Rabies Prevention - United States, 2008: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 57, n. RR-3, p. 1-28, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5703a1.htm>. Acesso em: 26/05/2024.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; GRECCO, F. B. *et al.* Raiva em bovinos na Região Sul do Rio Grande do Sul: epidemiologia e diagnóstico imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 331-335, abril 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/BQL88nMD4c8HdcCVCWxkyxb/>. Acesso em: 13/04/2024.

MARINHO, K. M. *et al.* Feasibility of replacing the viral isolation technique in mice with RT-qPCR for the diagnosis of rabies. **Ciência Rural**, v. 54, n. 8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230229>. Acesso em: 03/03/2024.

MARSTON, D. A. *et al.* Comparative analysis of the full genome sequence of European bat *Lyssavirus* type 1 and type 2 with other *Lyssavirus*es and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. **Virology**, v. 434, n. 1, p. 120-132, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82692-0>. Acesso em: 02/04/2024.

MARSTON, D. A. *et al.* Complete Genomic Sequence of European Bat *Lyssavirus* 1, Isolated from *Eptesicus isabellinus* in Spain. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, e01518-14, jan./fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01518-14>. Acesso em: 02/04/2024.

MAYEN, F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50, n. 10, p. 469-472, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00713.x>. Acesso em: 24/02/2024.

MEBATSION, T. Extensive attenuation of rabies virus by simultaneous changes of several amino acids of the glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 75, n. 23, p. 11496-11502, nov. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11496-11502.2001>. Acesso em: 08/03/2024.

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: **World Health Organization**, 1996. p. 9-27. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/38286/9241544791_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 26/05/2024.

MOCHIZUKI, N.; KAWASAKI, H.; SILVA, M.L.C.R.; AFONSO, J.A.B.; ITOU, T.; ITO, F.H.; SAKAI, T. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003-2009. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 32, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-32>. Acesso em: 07/08/2024

MORAES, G. C. **Inovação e ética: a adoção de técnicas substitutivas ao uso de animais no diagnóstico laboratorial da raiva**. 2023. Dissertação (Mestrado em Bioética, Ética Aplicada e Saúde Coletiva) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em regime de associação com a Universidade Federal do Rio de Janeiro, a Fundação Oswaldo Cruz e a Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2023. Disponível em: <https://www.bdtd.uerj.br:8443/handle/1/19660>. Acesso em: 22/04/2024.

NASRAUI, A. C. R. Estudo Comparativo Entre as Técnicas de Imunofluorescência Direta, Isolamento Viral em Camundongos e Isolamento Viral em Cultivo Celular Utilizadas no Diagnóstico da Raiva. São Paulo: **Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**, 2020. Disponível em: <https://fi-admin.bvsalud.org/document/view/9dxe2>. Acesso em: 04/04/2024.

NOKIREKI, T. *et al.* Tentative novel *Lyssavirus* in a bat in Finland. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 3, p. 593-596, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.12833>. Acesso em: 12/03/2024.

OLIVEIRA, R. N. *et al.* Rabies virus diversification in aerial and terrestrial mammals. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. e20190370, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0370.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Dia mundial contra a raiva**, 2023. Disponível em: https://www.paho.org/pt/campanhas/dia-mundial-contra-raiva-2023.

OVIEDO-PASTRANA, M. E.; OLIVEIRA, C. S. F.; CAPANEMA, R. O.; NICOLINO, R. R.; OVIEDO-SOCARRAS, T. J.; HADDAD, J. P. A. Trends in animal rabies surveillance in the endemic state of Minas Gerais, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003591.

PEIXOTO, Z. M. P. *et al.* Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples from Equine Origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 72-75, 6 abr. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000100017>. Acesso em: 04/04/2024.

ROCHA, S. M. **Raiva silvestre: o perfil epidemiológico no Brasil (2002 a 2012)**. 2014. 35 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/18365/3/2014_SileneManriqueRocha.pdf>. Acesso em: 02/08/2023.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B**. Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. **World Health Organization**, 2019. v. 2. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515306>. Acesso em: 21/03/2024.

RUPPRECHT, C. E.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. *Lyssavirus*es and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies [version 1; referees: 2 approved]. **Referee Status**, v. 6, n. 0, p. 1-22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>. Acesso em: 14/09/2023.

SAKAI, T. *et al.* Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA® cards. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 2, p. 140-143, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0227>. Acesso em: 14/06/2024.

SCHAEFER, R.; BATISTA, H.B.R.; FRANCO, A.C.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 161-170, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.023>. Acesso em: 07/08/2024

SCHNEIDER, M. C. *et al.* Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 25, 2009. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2009.v25n3/260-269>. Acesso em: 17/04/2024.

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, n. 1, p. 51-61, 2010. Disponível em:< https://doi.org/10.1038/nrmicro2260>. Acesso em: 08/06/2024.

SILVEIRA, V. B. V. **Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras de animais no Brasil**. 2022. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-15082022-104343/pt-br.php>. Acesso em: 20/04/2024.

SODRÉ, M. M.; GAMA, A. R. DA; ALMEIDA, M. de. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 75-81, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200003>. Acesso em: 16/04/2024.

SOUSA, M. S.; RIBEIRO, W. L. C.; DUARTE, N. F. H.; ANDRE, W. P. P.; SANTIAGO, S. L. T. Transmissão da Raiva por Sagui (*Callithrix jacchus*) no Estado do Ceará, Brasil. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 7, n. 2, p. 270-287, 2013. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/download/86/2100>. Acesso em: 07/06/2024

SOUZA, D. N. Estudo de linhagens genéticas do vírus da raiva específicas aos morcegos *Desmodus rotundus* e *Artibeus lituratus*. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Instituto Pasteur de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/05/1368704/tese-debora-final-debora-nunes-souza.pdf>. Acesso em: 05/05/2024

SRINIVASAN, A. *et al.* Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1103-1111, 2005. DOI: 10.1056/NEJMoa043018.

STREICKER, D. G. *et al.* Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p. 3384-3392, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0538>. Acesso em: 17/04/2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2020005>. Acesso em: 15/06/2024.

TARRANT, S.; GREWAL, J.; YAGLOM, H.; LAWACZECK, E.; VENKAT, H. Zoonotic disease exposure risk and rabies vaccination among wildlife professionals. **Ecohealth**, v. 17, n. 1, p. 74-83, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10393-020-01469-w>. Acesso em: 17/06/2024.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory Techniques in Rabies**. Geneva: **World Health Organization**, 1996. p. 28-51. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/38286/9241544791_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 19/06/2024.

VOLOCH, C. M. *et al.* Analysis of adaptive evolution in *Lyssavirus* genomes reveals pervasive diversifying selection during species diversification. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4465-4478, 2014. PMCID: PMC4246234. pmid:25415197. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v6114465>. Acesso em: 21/04/2024.

VOS, A.; MULLER, T.; DIRKES, E.; GOLLER, K.; ROTHE, J. The occurrence of rabies in pre-Columbian Central America: an historical search. **Epidemiol Infect**, v. 10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0950268811001440>. Acesso em: 13/04/2024.

WADA, M. Y.; COSTA, B. P.; MORAES, E. N.; DELGADO, R. E. Situação da Raiva no Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 2000-2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742011000400010>. Acesso em: 12/04/2024.

WADHWA, A. *et al.* A Pan-*Lyssavirus* Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other *Lyssavirus*es. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, e0005258, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005258>. Acesso em: 13/03/2023.

WARRELL, M. J.; WARRELL, D. A. Rabies: the clinical features, management and prevention of the classic zoonosis. **Clinical Medicine**, London, v. 15, n. 1, p. 78-81, 2015. DOI: 10.7861/clinmedicine.14-6-78.

WEIR, D. L. *et al.* Recent observations on Australian bat *Lyssavirus* tropism and viral entry. **Viruses**, v. 6, n. 2, p. 909-926, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v6020909>. Acesso em: 11/04/2024.

WHO. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva: **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/272364>. Acesso em: 01/05/2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies**. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>. Acesso em: 12/03/2024.
WUNNER, W. H. Rabies Virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (ed.). **Rabies**. 2. ed. Cambridge: **Academic Press**, 2007. p. 23-69. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/B978-012369366-2/50004-X>. Acesso em: 11/04/2024.

WUNNER, W. H.; CONZELMANN, K. Rabies. In: FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. (Eds.). **Rabies Virus**. 4. ed. **Elsevier**, 2020. p. 43-81. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128187050000029?via%3Dihub>. Acesso em: 11/04/2024.

YUHONG, W. Rabies and Rabid Dogs in Sumerian and Akkadian Literature. **Journal of the American Oriental Society**, v. 121, n. 1, p. 32, 2001. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A78131771/LitRC?u=anon~462d6fc2&sid=googleScholar&xid=56fc6491>. Acesso em: 12/04/2024.

ZINKE, G. Neue Ansichten der Hundswuth, ihre Ursachen und Folgen, nebst einer sichern Behandlungsart der von tollen Tieren gebissenen Menschen. **Revista Jena**, v. 16, p. 212-218, 1804.

APÊNDICE A - Resultados individuais das amostras submetidas à: Imunofluorescência Direta, Isolamento Viral em Camundongo e RT-PCR LN34 Pan-*Lyssavirus* (LN34 e β-actina).

				RT- qPCR Pan-*Lyssavirus*		
Amostra	**Espécie**	**IFD**	**IC**	**Ct β-actina**	**Ct LN34**	**Resultado**
IMA33/23	Sagui	Negativo	Negativo	22,409	ND	Negativo
IMA34/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,751	26,640	Positivo
IMA35/23	Bovino	Positivo	-	30,037	21,610	Positivo
IMA36/23	Bovino	Positivo	-	31,858	20,361	Positivo
IMA37/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA38/23	Equino	Negativo	Negativo	22,278	ND	Negativo
IMA39/23	Equino	Negativo	Negativo	22,826	ND	Negativo
IMA40/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,378	ND	Negativo
IMA41/23	Equino	Negativo	Negativo	24,178	27,550	Positivo
IMA42/23	Bovino	Positivo	-	29,5275	15,236	Positivo
IMA43/23	Equino	Negativo	Negativo	23,384	ND	Negativo
IMA44/23	Caprino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA45/23	Bovino	Positivo	-	32,634	22,836	Positivo
IMA47/23	Equino	Negativo	Negativo	25,674	ND	Negativo
IMA48/23	Equino	Negativo	Negativo	25,883	ND	Negativo
IMA49/23	Bovino	Negativo	Negativo	31,178	ND	Negativo
IMA50/23	Bovino	Positivo	-	30,298	21,166	Positivo
IMA51/23	Bovino	Positivo	-	ND	28,344	Positivo
IMA52/23	Bovino	Positivo	-	ND	28,382	Positivo

IMA53/23	Bovino	Positivo	-	32,737	25,102	Positivo
IMA54/23	Caprino	Negativo	Negativo	19,434	34,024	Positivo
IMA55/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,468	ND	Negativo
IMA56/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,042	ND	Negativo
IMA57/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA58/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,319	ND	Negativo
IMA59/23	Bovino	Positivo	-	ND	31,819	Positivo
IMA60/23	Bovino	Positivo	-	31,414	16,125	Positivo
IMA62/23	Equino	Negativo	Negativo	30,029	24,106	Positivo
IMA63/23	Equino	Negativo	Negativo	18,727	ND	Negativo
IMA64/23	Bovino	Positivo	-	29,653	21,852	Positivo
IMA67/23	Bovino	Positivo	-	28,744	17,657	Positivo
IMA68/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,488	ND	Negativo
IMA69/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,635	ND	Negativo
IMA70/23	Equino	Negativo	Negativo	26,897	ND	Negativo
IMA71/23	Bovino	Positivo	-	ND	24,760	Positivo
IMA72/23	Bovino	Positivo	-	ND	26,755	Positivo
IMA73/23	Bovino	Positivo	-	ND	ND	Inconclusivo
IMA74/23	Equino	Negativo	Negativo	25,549	ND	Negativo
IMA75/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,987	ND	Negativo
IMA76/23	Bovino	Positivo	-	28,862	22,285	Positivo
IMA77/23	Equino	Positivo	-	24,851	18,265	Positivo
IMA78/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,125	ND	Negativo
IMA79/23	Bovino	Positivo	-	28,031	19,596	Positivo
IMA80/23	Bovino	Negativo	Negativo	32,346	ND	Negativo
IMA81/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,384	ND	Negativo
IMA82/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,079	ND	Negativo
IMA83/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,891	ND	Negativo
IMA84/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,190	ND	Negativo

IMA89/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,570	ND	Negativo
IMA90/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,973	ND	Negativo
IMA91/23	Bovino	Positivo	-	28,328	20,364	Positivo
IMA92/23	Equino	Negativo	Negativo	20,867	ND	Negativo
IMA93/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA94/23	Bovino	Positivo	-	25,956	18,870	Positivo
IMA95/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,468	33,225	Positivo
IMA96/23	Bovino	Positivo	-	28,317	20,929	Positivo
IMA99/23	Bovino	Negativo	Negativo	25,022	ND	Negativo
IMA100/23	Equino	Positivo	-	24,754	20,862	Positivo
IMA101/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,393	33,960	Positivo
IMA102/23	Bovino	Positivo	-	28,557	24,403	Positivo
IMA103/23	Bovino	Negativo	Negativo	37,311	ND	Inconclusivo
IMA104/23	Equino	Negativo	Negativo	22,497	ND	Negativo
IMA105/23	Equino	Negativo	Negativo	23,874	26,138	Positivo
IMA111/23	Equino	Negativo	Negativo	27,053	ND	Negativo
IMA112/23	Equino	Positivo	-	ND	20,023	Positivo
IMA113/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,802	ND	Negativo
IMA114/23	Bovino	Negativo	Negativo	25,785	ND	Negativo
IMA117/23	Bovino	Positivo	-	26,299	17,799	Positivo
IMA118/23	Equino	Negativo	Negativo	22,855	ND	Negativo
IMA119/23	Bovino	Positivo	-	ND	16,332	Positivo
IMA120/23	Bovino	Positivo	-	28,357	14,449	Positivo
IMA121/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,839	ND	Negativo
IMA123/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,975	ND	Negativo
IMA124/23	Equino	Negativo	Negativo	25,264	ND	Negativo
IMA125/23	Equino	Negativo	Negativo	22,299	ND	Negativo
IMA128/23	Equino	Negativo	Negativo	25,561	ND	Negativo
IMA130/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,956	ND	Negativo

IMA131/23	Bovino	Negativo	Negativo	30,409	ND	Negativo
IMA132/23	Bovino	Positivo	-	ND	30,842	Positivo
IMA136/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,679	ND	Negativo
IMA138/23	Equino	Negativo	Negativo	24,159	ND	Negativo
IMA139/23	Bovino	Positivo	-	ND	24,158	Positivo
IMA140/23	Equino	Positivo	-	23,345	23,850	Positivo
IMA141/23	Equino	Negativo	Negativo	23,9885	33,605	Positivo
IMA142/23	Bovino	Positivo	-	ND	25,710	Positivo
IMA146/23	Bovino	Positivo	-	24,125	18,262	Positivo
IMA147/23	Bovino	Positivo	-	25.771	21,174	Positivo
IMA148/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,229	ND	Negativo
IMA149/23	Bovino	Positivo	-	24,081	23,001	Positivo
IMA150/23	Equino	Negativo	Negativo	29,339	31,437	Positivo
IMA151/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,219	ND	Negativo
IMA152/23	Bovino	Negativo	Negativo	30,600	ND	Negativo
IMA153/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,818	ND	Negativo
IMA154/23	Equino	Negativo	Negativo	24,675	ND	Negativo
IMA155/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA156/23	Bovino	Positivo	-	ND	23,355	Positivo
IMA157/23	Bovino	Positivo	-	24,252	22,9915	Positivo
IMA158/23	Bovino	Positivo	-	ND	28,525	Positivo
IMA159/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,752	ND	Negativo
IMA160/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,555	ND	Negativo
IMA161/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,005	ND	Negativo
IMA162/23	Bovino	Negativo	Negativo	36,482	ND	Inconclusivo
IMA163/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,012	ND	Negativo
IMA164/23	Bovino	Positivo	-	29,392	27,478	Positivo
IMA165/23	Bovino	Negativo	Negativo	32,262	ND	Negativo
IMA166/23	Bovino	Negativo	Negativo	30,529	ND	Negativo

IMA167/23	Bovino	Positivo	-	ND	15,406	Positivo
IMA168/23	Equino	Negativo	Negativo	23,547	ND	Negativo
IMA171/23	Bovino	Positivo	-	31,498	24,275	Positivo
IMA172/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,347	30,681	Positivo
IMA173/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo
IMA174/23	Bovino	Negativo	Negativo	20,938	ND	Negativo
IMA175/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,125	ND	Negativo
IMA176/23	Equino	Negativo	Negativo	29,54	ND	Negativo
IMA177/23	Bovino	Negativo	Negativo	24,291	ND	Negativo
IMA178/23	Bovino	Positivo	-	ND	21,969	Positivo
IMA179/23	Equino	Negativo	Negativo	24,326	ND	Negativo
IMA180/23	Bovino	Positivo	-	35,350	33,794	Positivo
IMA181/23	Bovino	Negativo	Negativo	31,478	ND	Negativo
IMA182/23	Bovino	Positivo	-	29,476	23,508	Positivo
IMA183/23	Bovino	Positivo	-	ND	30,677	Positivo
IMA184/23	Bovino	Negativo	Negativo	25,631	ND	Negativo
IMA185/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,493	ND	Negativo
IMA187/23	Bovino	Positivo	-	25,532	20,178	Positivo
IMA188/23	Bovino	Negativo	Negativo	26,680	ND	Negativo
IMA189/23	Bovino	Positivo	-	ND	ND	Inconclusivo
IMA190/23	Bovino	Positivo	-	ND	23,802	Positivo
IMA191/23	Bovino	Negativo	Negativo	31,373	ND	Negativo
IMA192/23	Equino	Negativo	Negativo	26,239	ND	Negativo
IMA193/23	Bovino	Negativo	Negativo	28,975	27,373	Positivo
IMA194/23	Equino	Positivo	-	27,681	21,820	Positivo
IMA195/23	Caprino	Negativo	Negativo	27,115	ND	Negativo
IMA196/23	Bovino	Positivo	-	ND	33,428	Positivo
IMA199/23	Bovino	Negativo	Negativo	29,934	ND	Negativo
IMA200/23	Bovino	Negativo	Negativo	ND	ND	Inconclusivo

IMA201/23	Equino	Negativo	Negativo	21,518	ND	Negativo
IMA202/23	Bovino	Positivo	-	27,584	20,118	Positivo
IMA203/23	Equino	Negativo	Negativo	23,090	ND	Negativo
IMA204/23	Bovino	Negativo	Negativo	30,675	ND	Negativo
IMA205/23	Bovino	Negativo	Negativo	25,754	ND	Negativo
IMA206/23	Bovino	Negativo	Negativo	25,708	ND	Negativo
IMA207/23	Bovino	Negativo	Negativo	24,616	ND	Negativo
IMA208/23	Equino	Positivo	-	ND	18,433	Positivo
IMA209/23	Bovino	Positivo	-	28,189	17,775	Positivo
IMA210/23	Bovino	Positivo	-	30,619	25,339	Positivo
IMA211/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,142	ND	Negativo
IMA212/23	Bovino	Positivo	-	ND	20,601	Positivo
IMA213/23	Bovino	Negativo	Negativo	27,814	ND	Negativo
IMA216/23	Bovino	Positivo	-	ND	24,524	Positivo

IFD: Imunofluorescência Direta; IC: Inoculação em Camundongo; Ct: Limiar de Ciclo; ND: Não detectado.