



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA RAIVA A PARTIR DE DIFERENTES SEGMENTOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE EQUINOS DO MATO GROSSO DO SUL

LETÍCIA DA SILVA FERREIRA RIBEIRO MATHIAS

**Campo Grande – MS
2025**

LETÍCIA DA SILVA FERREIRA RIBEIRO MATHIAS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA RAIVA A PARTIR DE
DIFERENTES SEGMENTOS DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE EQUINOS DO MATO GROSSO DO SUL**

*Molecular diagnosis of rabies from different segments of the central nervous
system in equines from Mato Grosso do Sul*

LETÍCIA DA SILVA FERREIRA RIBEIRO MATHIAS

Orientadora: Profa. Dra. Leila Sabrina Ullmann

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Campo Grande – MS
2025**

Inserir Folha de Aprovação assinada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a PCR convencional e a qPCR.....	19
Tabela 2. Primers e sonda utilizados no protocolo de one-step RT-qPCR para diagnóstico do vírus da raiva.....	24
Tabela 3. Condições de temperatura, tempo, ciclos e fases da one-step RT-qPCR.....	24
Tabela 4. Resultados do Cq obtido através da RT-qPCR nos diferentes fragmentos de SNC de equinos encaminhados para diagnóstico de raiva, com o tempo de início da sintomatologia e o tipo de óbito dos equinos.....	27
Tabela 5. Resultados da IFD nos diferentes fragmentos de SNC de equinos encaminhados para diagnóstico de raiva.....	28
Tabela 6. Coeficiente de Kappa para todos os fragmentos de sistema nervoso central de equinos para as técnicas de IFD e RT-qPCR.....	29
Tabela 7. Média e desvio padrão dos Cq de cada fragmento de sistema nervoso central das amostras de equinos utilizadas neste estudo.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição dos casos de raiva animal no Brasil no período de 1999 a 2023.....	13
Figura 2. Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva	14
Figura 3. Microscopia eletrônica do vírus da raiva.....	16
Figura 4. Esquema de coleta das amostras de sistema nervoso central de equinos para diagnóstico de raiva	22
Figura 5. Ilustração dos passos para realização da extração do RNA viral.....	23
Figura 6. Resultado da RT-qPCR representada através do gráfico de amplificação de todos os fragmentos de sistema nervoso central da amostra 1.....	26
Figura 7. Distribuição das amostras positivas de Mato Grosso do Sul recebidas para realização do projeto de pesquisa.....	29

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Histórico e ocorrência da doença.....	12
2.2 Etiologia e patogenia.....	13
2.2 Genoma e virologia	15
2.3 Diagnóstico	16
2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Imunofluorescência direta	22
4.2 Extração do RNA do vírus da raiva	23
4.3 <i>One-step</i> RT-qPCR.....	23
4.4 Distribuição geográfica.....	25
4.5 Análise estatística	25
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	33
8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	34
9. REFERÊNCIAS.....	36

RESUMO

MATHIAS, L. S. F. R. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA RAIVA A PARTIR DE DIFERENTES SEGMENTOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE EQUINOS DO MATO GROSSO DO SUL. 2025. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

A raiva é uma antroponose causada pelo *Lyssavirus rabies*, levando à encefalite aguda, progressiva e fatal em quase todos os casos, configurando um problema de saúde pública mundial. O método laboratorial padrão ouro para o diagnóstico da raiva é a imunofluorescência direta (IFD) aliada à prova biológica (PB) pela inoculação intracerebral em camundongos, que vem sendo substituída pelo diagnóstico molecular. Há relatos de diferenças na distribuição viral nas estruturas do sistema nervoso central (SNC) de equinos, tendo maior detecção em tronco encefálico e medula espinhal. Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar as diferenças na detecção do vírus da raiva em porções distintas do SNC, incluindo córtex, cerebelo, tálamo, hipocampo, medula cranial, torácica e lombar pela reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) para quantificação do ácido nucleico presente em cada segmento do SNC de equinos, em conjunto com os resultados da IFD realizadas separadamente com cada segmento do SNC. Entre 2022 e 2024, foram coletadas 33 amostras de sistema nervoso central de equinos com sintomatologia nervosa e de diferentes períodos de início e óbito (eutanásia ou morte natural), suspeitos de raiva, encaminhadas à IAGRO-MS. Após o recebimento, o RNA do vírus da raiva era imediatamente extraído com Trizol para evitar perdas do material após processos sucessivos de congelamento e descongelamento. Todas as amostras foram submetidas à RT-qPCR. Das 33 amostras recebidas, somente doze (12) foram positivas para raiva, e dessas, somente a amostra um (1) possuía todos os sete fragmentos solicitados para diagnóstico. Nesta amostra, a porção da medula lombar apresentou o menor *Cq* (25,19), com uma diferença de pelo menos 3,8 *Cq*, quando comparado aos demais fragmentos de SNC. Isto representa que a porção da medula lombar, nesta amostra, possuía carga viral oito (8) vezes maior que os demais fragmentos de SNC. Nas amostras dois (2) e seis (6), a medula cervical apresentou menor *Cq*, enquanto as amostras cinco (5), sete (7), nove (9), dez (10) e doze (12) o córtex. Não houve um padrão único de distribuição da carga viral no SNC dos equinos estudados. Algumas amostras apresentaram maior carga viral na medula lombar, enquanto outras tiveram maior concentração no córtex, tálamo ou cerebelo. Esses achados reforçam a importância de coletar múltiplos fragmentos do SNC para um diagnóstico preciso.

Palavras-chave: *Lyssavirus rabies*, RT-qPCR, vigilância, zoonoses.

ABSTRACT

MATHIAS, L. S. F. R. Molecular diagnosis of rabies from different segments of the central nervous system in equines from Mato Grosso do Sul. 2025. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2025.

Rabies is an anthroponosis caused by *Lyssavirus rabies*, leading to acute, progressive, and fatal encephalitis in nearly all cases, constituting a global public health concern. The gold standard laboratory method for rabies diagnosis is direct immunofluorescence (IFD) combined with the biological test (PB) through intracerebral inoculation in mice, which has been increasingly replaced by molecular diagnosis. Reports indicate differences in viral distribution within the central nervous system (CNS) structures of equines, with higher detection rates in the brainstem and spinal cord. Thus, the present study aimed to assess the differences in rabies virus detection across distinct CNS regions, including the cortex, cerebellum, thalamus, hippocampus, and cervical, thoracic, and lumbar spinal cord segments, using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) to quantify the nucleic acid present in each SNC segment of equines. These findings were analyzed alongside the DIF results obtained separately from each SNC

segment. Between 2022 and 2024, a total of 33 SNC samples were collected from equines exhibiting neurological symptoms, with varying disease onset and fatality (euthanasia or natural death), and suspected of rabies. These samples were submitted to IAGRO-MS for diagnostic evaluation. Upon receipt, rabies virus RNA was immediately extracted using Trizol to prevent material degradation due to repeated freeze-thaw cycles. All samples were subsequently analyzed by RT-qPCR. Among the 33 samples collected, only twelve (12) tested positive for rabies. Of these, only one (1) sample contained all seven SNC fragments required for diagnosis. In this sample, the lumbar spinal cord segment exhibited the lowest Cq value (25.19), indicating a difference of at least 3.8 Cq compared to the other SNC fragments. This finding suggests that the lumbar spinal cord portion in this sample harbored an eightfold higher viral load than the other SNC segments. In samples two (2) and six (6), the cervical spinal cord exhibited the lowest Cq value, whereas in samples five (5), seven (7), nine (9), ten (10), and twelve (12), the cortex had the lowest Cq. No consistent pattern of viral load distribution was observed in the equine SNC. Some samples showed higher viral loads in the lumbar spinal cord, while others had greater concentrations in the cortex, thalamus, or cerebellum. These findings reinforce the importance of collecting multiple SNC fragments to ensure accurate rabies diagnosis.

Keywords: *Lyssavirus rabies*, RT-qPCR, surveillance, zoonoses.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem aproximadamente 5,8 milhões de equinos, o que representa o quarto maior rebanho equestre do mundo, e Mato Grosso do Sul possui 415 mil equinos sendo o sexto estado em número de animais no país (IBGE, 2024). De acordo com o Instituto Brasileiro de Equideocultura (2023), estima-se que o mercado equestre movimenta R\$ 35 bilhões por ano e gera empregos diretos e indiretos para mais de 3 milhões de famílias.

Mesmo com o avanço da tecnologia e o desenvolvimento de novas ferramentas para realização de atividades pecuárias e agrícolas, o cavalo continua sendo de grande importância para lida (trabalho), esporte, lazer e criação (BRASIL, 2016). De outro lado, os equinos são acometidos por diversas encefalites fatais, sendo a raiva a enfermidade neurológica de maior importância nessa espécie. Assim, é necessário que seja realizado diagnóstico etiológico sensível e rápido para vigilância epidemiológica da doença, realização de intervenções quanto à vacinação de herbívoros suscetíveis e tratamento pós-exposição humana, avaliando possíveis falhas das técnicas diagnósticas e análises de informações obtidas nos casos suspeitos e confirmados.

A raiva é uma zoonose viral e tem como agente etiológico o vírus *Lyssavirus rabies* e é caracterizado por uma encefalomielite aguda, progressiva e com letalidade próxima a 100% em humanos e de 100% nos animais, representando um grave problema de saúde pública. A doença afeta mamíferos e pode ser transmitida por meio do contato com a saliva de animais infectados através de mordeduras, arranhaduras e/ou lambedura. A cadeia epidemiológica está dividida em quatro ciclos: rural, urbano, silvestre aéreo e silvestre terrestre. Os equinos estão presentes no ciclo rural, e geralmente, se infectam através da espoliação por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009; BRASIL 2023).

Até o momento no Brasil, foram identificadas setes variantes antigênicas do vírus da raiva (RABV) e cada uma associada a um reservatório específico. Em cães, foram isoladas as variantes AgV1 e AgV2, enquanto a AgV3 foi encontrada em morcegos hematófagos da espécie *D. rotundus* (morcego vampiro). Já as variantes AgV4 e AgV6 foram detectadas em morcegos insetívoros, como *Tadarida brasiliensis* (morcego das casas) e *Lasiurus cinereus*. Além disso, duas variantes com perfis antigênicos distintos foram identificadas: uma em *Cerdocyon thous*

(cachorro-do-mato) e outra em *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco) (BRASIL, 2024).

Devido ao prognóstico da doença, o diagnóstico em animais só pode ser realizado *post mortem* através de amostras de sistema nervoso central (SNC) dos infectados. Na legislação brasileira são recomendados o envio de cinco fragmentos de SNC, sendo córtex, cerebelo, tálamo, hipocampo e preferencialmente, uma porção da medula espinhal, especialmente em equinos. Na incompletude dos fragmentos, o laudo do exame pode ser liberado com o envio de, no mínimo, três fragmentos de SNC (BRASIL, 2022).

A técnica padrão ouro para diagnóstico é a técnica de imunofluorescência direta (IFD) em conjunto com a prova biológica com inoculação intracerebral em camundongos. No entanto, a detecção do antígeno presente na IFD não ocorre em todos os casos de raiva em equinos e sua ausência não exclui o diagnóstico. Além disso, estudos indicam que 50% dos equinos não apresentam corpúsculos de inclusão, tornando obrigatória a realização da PB para comprovação do resultado diagnóstico. Também foram encontrados estudos relatando que a distribuição do vírus no SNC de equinos não é homogênea, tendo maior detecção em amostras da medula espinhal (GREEN *et al.*, 1992; BRASIL, 2008; BRASIL, 2024).

Dessa forma, métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos são necessários para evitar a ocorrência de falsos negativos e consequentemente, o aparecimento de novos de raiva nas regiões acometidas pela enfermidade. Por isso, as técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas para diagnóstico de doenças de forma assertiva, com bom custo-benefício e agilidade na liberação dos resultados. Além disso, técnicas como a PCR em tempo real permitem a obtenção de resultados qualiquantitativos, permitindo fazer inferências quanto a carga viral presente nos fragmentos.

Entender sobre a distribuição da carga viral do vírus da raiva em equinos pode contribuir para o estabelecimento de melhores estratégias para o diagnóstico da doença, se existem diferença entre os fragmentos de SNC sendo imprescindível o envio de determinada porção, melhorias nas estratégias de prevenção e controle com resultados mais rápidos e bem como melhorias para a população humana, uma vez que a raiva é uma zoonose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e ocorrência da doença

Na história, o primeiro relato da raiva é controverso, uma vez que é encontrado na literatura mais de uma versão, entretanto a mais aceita é do primeiro registro no ano 23 antes de Cristo sendo registrado na literatura como “vírus da loucura” no Código de Eshnunna, atestando uma ligação entre a mordida de um animal raivoso e uma morte humana em decorrência desta agressão. O primeiro grande surto da doença só foi descrito em 1271 na Francônia localizada na Alemanha, quando vários lobos raivosos invadiram cidades e vilas atacando rebanhos e pessoas na região, levando a 30 óbitos em decorrência da raiva (BLANCOU, 2004; ALMEIDA & QUEIROZ, 2023).

Na América do Norte, os primeiros registros oficiais ocorreram em 1753 no Estados Unidos em um cão e em 1819 no Canadá em um humano. Já na América Latina, no México a doença era conhecida desde 1709, enquanto na Argentina, somente em 1806. No Brasil, através de estudos filogenéticos sobre a história evolutiva da variante canina do vírus da raiva, a introdução do vírus ocorreu entre o final do século XIX e início do século XX. Não foram encontrados relatos na literatura acerca dos primeiros casos ocorridos no estado do Mato Grosso do Sul. O primeiro caso humano relatado no estado foi em 1990 e o último em 2015 (KOBAYASHI *et al.* 2011; MORATO *et al.* 2011; BRASIL, 2024b).

No Brasil, no período de 1986 a outubro de 2024, foram registrados 797 casos de raiva humana, sendo 527 transmitidos por cães e 270 por outras espécies. O último caso de raiva humana transmitido por cão com variante canina (AgV1) foi em 2015 no município de Corumbá localizado no Mato Grosso do Sul. No período de 1999 a 2023, foram registrados no Brasil 52.071 casos de raiva animal e destes, 2.237 ocorreram em Mato Grosso do Sul (Figura 1). Quanto aos dados por espécie animal, no período de 1999 a 2023 em Mato Grosso do Sul, 1965 casos foram registrados em bovinos, 131 em equinos, 95 em caninos, 43 em animais silvestres, 2 em ovinos e 1 em felinos (BRASIL, 2024b; MAPA, 2024).

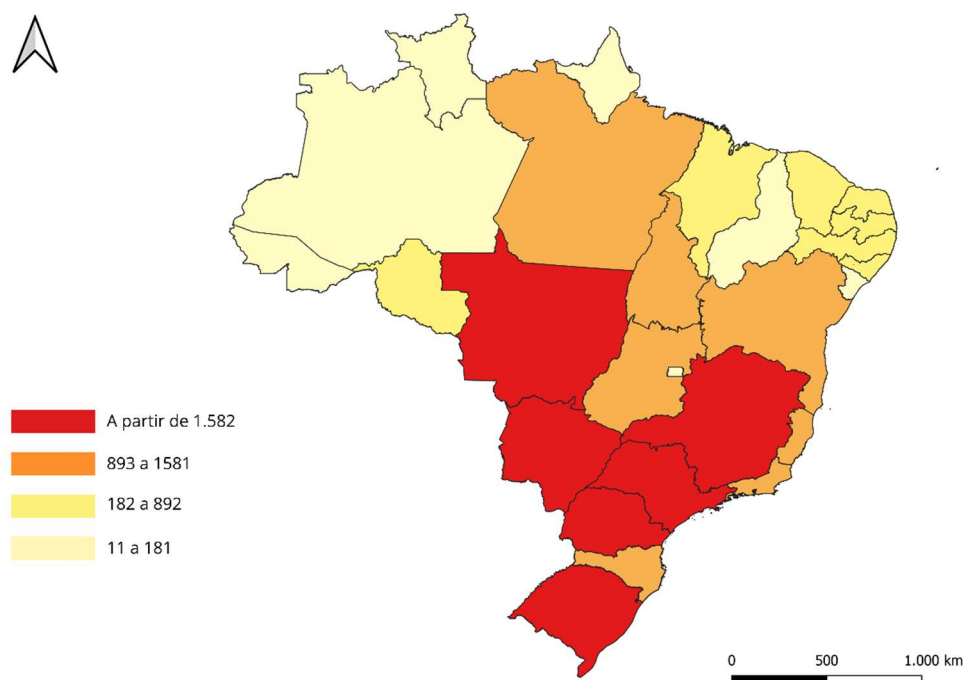


Figura 1. Mapa de distribuição dos casos de raiva animal no Brasil no período de 1999 a 2023. Fonte: elaborado pela autora, 2025.

2.2 Etiologia e patogenia

A raiva é uma antroponose causada pelo *L. rabies*, gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, e trata-se de uma encefalomielite aguda, progressiva e fatal em quase 100% dos casos, configurando um problema de saúde pública com elevado custo social e econômico. Acomete os mamíferos e sua transmissão ocorre, principalmente, através da saliva de um animal infectado pela mordedura, arranhadura e/ou lambedura. A transmissão por membranas mucosas, como olhos, nariz e boca, e por aerossóis também já foram relatadas na literatura (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009; BRASIL, 2024; ICTV, 2024).

A cadeia epidemiológica da enfermidade é dividida em quatro ciclos (Figura 2), sendo: urbano, com ocorrência em cães e gatos; rural, em herbívoros, como bovinos e equinos; e o silvestre subdividido em terrestre e aéreo, envolvendo diferentes espécies de morcegos (BRASIL, 2023). No ciclo rural, a transmissão ocorre principalmente pela mordedura de morcegos hematófagos *D. rotundus* (BRASIL, 2008). Esta espécie tem ampla distribuição, estando presente em todos os estados do Brasil, tendo boa capacidade de adaptação aos diferentes habitats,

usando desde abrigos naturais, como cavernas e árvores ocas, e artificiais como bueiros e construções abandonadas (DIAS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2018).

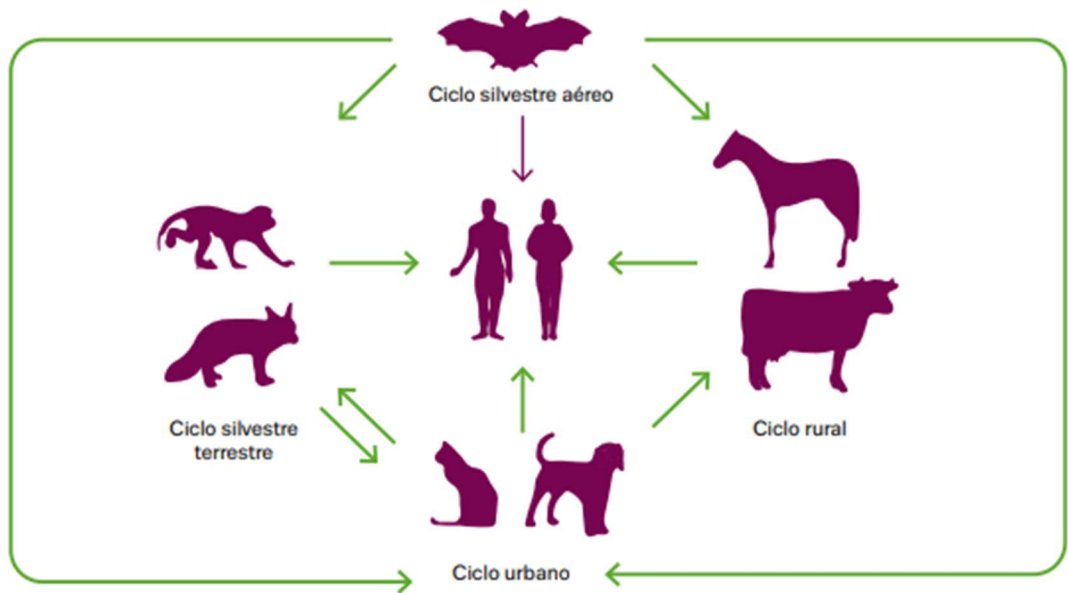


Figura 2. Ciclos epidemiológicos de transmissão da raiva. Fonte: BRASIL, 2024.

A espoliação em equinos por *D. rotundus* ocorre geralmente na região da escápula, cabeça e pescoço, sendo explicada por maior facilidade de apreensão já que usam a crina para sustentação (SAZIMA, 1978). A mordedura é feita por meio de dentes incisivos, sua saliva contém substância anticoagulante para facilitar a alimentação contínua, realizada por lambedura, durante o parasitismo. Os equinos também podem transmitir para os seres humanos. (DA SILVA *et al.*, 1997; BRASIL, 2024).

A patogenia da doença é similar em todas as espécies de mamíferos, com três formas descritas, como forma furiosa, silenciosa e/ou parálitica. Em equinos, as duas últimas formas são as predominantes, tendo sinais clínicos variáveis e inespecíficos, como depressão, incoordenação motora, decúbito lateral, levando a óbito do animal (GREEN *et al.*, 1992; BRASIL, 2008). Assim, possui baixa probabilidade de transmissão para outros animais (ACHKAR *et al.*, 2010), atuando como sentinelas e hospedeiros acidentais ou terminais da raiva. O período de incubação da doença é variável e está correlacionado à localização profundidade e extensão da lesão, distância entre o ferimento e as estruturas nervosas como cérebro e troncos nervosos e até mesmo da concentração e cepa viral inoculada. Nos herbívoros, a incubação pode variar de 25 a 90 dias; 40 a 120 dias em cães

domésticos; média de 45 dias nos humanos; e indefinido em quirópteros (BRASIL, 2008; BRASIL, 2024).

A replicação viral ocorre lentamente no local da inoculação inicialmente nas células da musculatura ou tecido subepitelial até atingir concentração para alcançar as terminações nervosas (período de replicação extraneural), sendo responsável pelo período de incubação da doença. O vírus se liga ao receptor acetilcolina nicotínico presente nas junções neuromusculares através da glicoproteína, e em seguida, atinge os nervos periféricos por trajeto centrípeto em direção ao sistema nervoso central (SNC), seguindo fluxo axonal retrógrado (12 a 100 mm/dia). Ao atingir o SNC, ocorre replicação maciça, migração centrífuga e disseminação para sistema nervoso parassimpático atingindo as áreas periféricas como a córnea e glândulas salivares. Além disso, a distribuição do vírus não é homogênea no SNC e pode variar de espécie para espécie (BRASIL, 2008; JACKSON, 2010; BANYARD & FOOKS, 2020)

2.2 Genoma e virologia

O vírus da raiva (RABV), pertence a ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Quanto à sua morfologia, apresenta formato de projétil com dimensões variando entre 60-110 nanômetros de diâmetro e 130-250 nanômetros de comprimento (Figura 3). Sua estrutura é composta por um nucleocapsídeo helicoidal interno, de aproximadamente 50 nanômetros de diâmetro, e um envelope lipídico; a membrana possui de 300 a 400 projeções em formato de espícula compostas pela proteína G, essenciais para a entrada do vírus na célula hospedeira (HUMMELER *et al.*, 1967; GAUDIN *et al.*, 1992; WHELAN & BLOYET, 2007; ICTV, 2024).



Figura 3. Microscopia eletrônica do vírus da raiva. FONTE: CDC, 1975.

Apresenta um genoma de aproximadamente 12 Kb, RNA não segmentado de fita simples e sentido negativo, composto por cinco proteínas com propriedades antigênicas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), glicoproteína (G) e RNA-polimerase RNA-dependente (L). A glicoproteína (G) é responsável pela recepção e fusão do envelope do vírus RABV na superfície da célula do hospedeiro e podem sofrer rearranjos durante este processo, promovendo a resposta patogênica. A proteína M (matriz), interliga o envelope e o nucleocapsídeo. A nucleoproteína (N) é responsável por encapsular o RNA viral, o componente essencial para sua síntese uma vez que a polimerase utiliza somente o genoma com capsídeo como molde. A proteína L (proteína polimerase) e proteína P (fosfoproteína) realizam todas as atividades catalíticas necessária para que ocorra a transcrição, replicação do genoma, transporte axoplasmático e a síntese do RNA (WHELAN & BLOYET, 2007; KOTAIT *et al.*, 2009; FLORES, 2017; ICTV, 2024).

O RABV, assim como outros vírus de genoma RNA, é replicado por uma polimerase propensa a mutações que se acumulam em curtos períodos. No entanto, também há uma pressão seletiva contra mutações não sinônimas, e a evolução do RABV ao longo do tempo, portanto, é lenta (TORDO *et al.* 1986; SCHNELL *et al* 2010; ICTV 2024).

Sete variantes antigênicas (AgV) do RABV foram isoladas no Brasil, associadas a reservatórios específicos: em cães foram encontradas AgV1 e AgV2; em morcegos hematófagos (*D. rotundus*) AgV3; e em morcegos insetívoros (*T. brasiliensis* e *L. cinereus*) AgV4 e AgV6; duas variantes com perfil antigênico não compatível, uma isolada em cachorro do mato (*C. thous*) e outra em saguis de tufo branco (*C. jacchus*) (BRASIL, 2024).

2.3 Diagnóstico

Devido à variabilidade das manifestações clínicas e ao prognóstico da doença, não é possível realizar diagnóstico *antemortem* em animais, devendo ser enviadas amostras de sistema nervoso central (SNC), contendo todo o encéfalo ou fragmentos do córtex, cerebelo, hipocampo, bulbo e fragmentos das porções inicial, medial e terminal da medula espinhal para diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2008).

O método laboratorial padrão ouro para diagnóstico da raiva é a imunofluorescência direta (IFD) aliada à prova biológica (PB) através da inoculação intracerebral em camundongos (BRASIL, 2008). Entretanto, Peixoto *et al.* (2000), demonstraram menor sensibilidade da IFD a partir de amostras equinas quando comparada a outras espécies. Também existem outras técnicas diagnósticas como isolamento viral em camundongos (IVC) ou isolamento viral em cultivo celular (IVCC), exame histopatológico, técnicas de biologia molecular como reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (BRASIL, 2008; WHO 2018; WOA, 2023), sendo as técnicas moleculares as mais promissoras atualmente.

A imunofluorescência direta (IFD) é baseada na impressão de fragmentos de tecido nervoso em lâminas de vidro com utilização de conjugado antirrábico, submetido à luz ultravioleta, que ao reagirem entre si, emitem uma luz esverdeada fluorescente. À microscopia de fluorescência, a presença do antígeno pode ser observada por estruturas fluorescentes, variando de tamanho pequeno, como poeira antigênica. O resultado deve ser liberado após 24 horas do recebimento da amostra no laboratório (BRASIL, 2008).

A realização da prova biológica (PB) é necessária para confirmação do diagnóstico dado pela IFD. A técnica consiste na inoculação intracerebral em camundongos (MIT) com suspensão preparada a partir de fragmento de tecido de SNC de animais suspeitos com diluente de vírus. O animal de eleição para o isolamento é o camundongo da espécie *Mus musculus* (camundongo albino suíço), por sua elevada sensibilidade ao vírus rábico. O camundongo utilizado deve ser de boa procedência e apresentar bom estado sanitário, com idade e peso adequados. Para realização da PB são necessários de 8 a 10 camundongos por amostra recebida, com 21 dias de idade e pesando entre 11 a 14g (MAPA, 2008; WHO 2018).

Para inoculação são utilizadas seringas agulhadas de até 1,0 mL, contendo a dose de 0,03 mL por camundongo (BRASIL, 2012). Assim, a técnica exige que o inoculador execute as boas práticas laboratoriais, a fim de evitar acidentes, como autoinoculação e morte dos animais decorrente de estresse ou má execução da técnica. Os camundongos inoculados são alocados no infectório separados das demais dependências do laboratório e observados diariamente por até 30 dias em busca de sintomatologia clínica compatível com a raiva (BRASIL, 2008; WHO,

2018). Caso ocorram sintomas ou óbito a partir do 5º dia da inoculação, o sistema nervoso do camundongo é coletado para realização de um novo teste IFD para confirmação do diagnóstico (CORONA, 2016). Por isso, métodos alternativos ao uso de animais, como a inoculação viral em cultivo celular ou métodos de biologia molecular, são mais adequados em termos éticos e de bem-estar animal evitando o sofrimento desnecessário, sendo gradativamente implantados nos laboratórios diagnósticos e apresentam bons resultados quando comparados às técnicas IFD e PB em camundongos (BONES; MOLENTO, 2012).

2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação enzimática que permite a multiplicação exponencial de uma sequência específica de DNA. A técnica é baseada em ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão. Durante a desnaturação, o DNA alvo é aquecido para separar a fita dupla e em seguida, *primers* ('iniciadores') específicos para as regiões da sequência alvo se ligam à fita simples durante o anelamento. A polimerase sintetiza novas cadeias de DNA a partir dos primers, ampliando a sequência alvo e este processo é repetido por vários ciclos, levando à amplificação exponencial da sequência alvo. A PCR revolucionou a biologia molecular, permitindo a amplificação de quantidades mínimas de DNA a partir de amostras complexas, possibilitando diversas aplicações cotidianas, incluindo o diagnóstico de doenças infecciosas (MULLIS *et al.*, 1986; BUSTIN *et al.*, 2009).

Uma das principais vantagens da PCR convencional é a simplicidade e baixo custo, entretanto, não permite a quantificação do produto amplificado. A Reação em Cadeia da Polimerase por Tempo Real (qPCR) é uma evolução da PCR convencional, permitindo a quantificação do DNA alvo em tempo real durante o processo de amplificação, sendo independente de métodos pós-PCR (Tabela 1), como a eletroforese em gel, para detectar os produtos amplificados, podendo ser realizada em uma única reação minimizando o risco de contaminação (HEID *et al.*, 1996; BUSTIN *et al.*, 2009).

344 **Tabela 1.** Comparação entre a PCR convencional e a qPCR.

Teste	Agente fluorescente	Particularidade	Análise dos resultados
PCR convencional	Não contém.	A quantidade do DNA alvo é amplificada e os resultados são visualizados após a finalização da PCR. Somente qualitativa.	Necessita da eletroforese para verificar a amplificação dos alvos.
qPCR	Contém.	A quantidade do DNA alvo amplificado é medida em cada ciclo durante a reação PCR e acompanhado em tempo real. Pode ser qualitativa e quantitativa. O número de cópias das moléculas alvo é quantificada através da comparação entre o <i>Cq</i> obtido em uma amplificação com uma curva padrão.	Em tempo real, dispensando uma etapa adicional.

345 Fonte: elaborado pela autora (2024).

346

347 Na qPCR, a quantidade do DNA alvo é medida após cada ciclo através de
348 corantes que produzem fluorescência proporcional ao número de produtos da PCR
349 (*amplicons*) gerados. Esta pode ser realizada de duas formas: utilizando corantes
350 fluorescentes que se ligam a qualquer DNA de fita dupla (dsDNA), como o SYBR
351 Green, ou sondas específicas, como as sondas TaqMan. No entanto, o uso de
352 sondas oferece maior especificidade, uma vez que a fluorescência é emitida
353 apenas quando a sonda se liga à sequência alvo, evitando a detecção de produtos
354 de amplificação não específicos. A fluorescência produzida ao longo da reação é

medida pelo equipamento e ao final, é gerado o gráfico de amplificação representando todos os ciclos da PCR. Os resultados são mensurados através do número de ciclos necessários (Ciclo de Quantificação – *Cq*) para que a fluorescência ultrapasse o limiar pré-definido (*Threshold*) e o valor do *Cq* é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo (HEID *et al.*, 1996; BUSTIN *et al.*, 2009; THERMO FISHER, 2016).

Atualmente, existem duas metodologias de qPCR quando o alvo inicial possui o RNA em seu genoma, a RT-qPCR *one step* e a *two step*, sendo o RNA transcrito para DNA complementar (cDNA), e este último utilizado como molde para a amplificação durante a qPCR. No método *two step*, o RNA é primeiro transcrito em cDNA em uma reação usando a transcriptase reversa e uma alíquota do cDNA resultante é usada como molde para várias reações de qPCR em outro tubo. Já no método *one step*, a transcrição e a qPCR são realizados no mesmo tubo (RT-qPCR) (THERMO FISHER, 2016).

2.5 Importância de coletar diferentes fragmentos de sistema nervoso central

A IFD é considerada padrão-ouro para o diagnóstico da raiva, mas em equinos, a sensibilidade da técnica pode ser reduzida, levando a resultados falso negativos. Isso ocorre porque a distribuição do vírus da raiva no sistema nervoso central (SNC) dos equinos não é homogênea, e a quantidade de antígeno viral pode variar entre as diferentes regiões do cérebro e da medula espinhal (SOUZA, 2019).

Além disso, o antígeno e/ou poeira antigênica nem sempre estão presentes em todos os casos de raiva em equinos e sua ausência não descarta o diagnóstico da doença. Em 50% das amostras obtidas nesses animais não apresentam formação dos corpúsculos de Negri (corpúsculo de inclusão) na histopatologia, sendo justificada nessa espécie pela rápida evolução, com período de incubação curto e óbito em 3 a 4 dias após início das manifestações neurológicas, não havendo tempo suficiente para formação e, consequente, visualização das inclusões (GREEN *et al.*, 1992; PEIXOTO *et al.*, 2000; BRASIL, 2008).

Na legislação brasileira é recomendado o envio de cinco (5) fragmentos de SNC de herbívoros para o diagnóstico da raiva, entretanto, na ausência deste quantitativo, é permitido que o laudo seja liberado com o envio de pelo menos três (3) fragmentos distintos (BRASIL, 2008). Na literatura, diversos autores relatam observar diferenças na distribuição viral nas estruturas do sistema nervoso central

de equinos, tendo maior detecção em amostras de tronco encefálico e medula espinhal (SILVA *et al.*, 1974; BASSUINO *et al.*, 2016), ressaltando a importância do envio diferentes fragmentos para a realização do diagnóstico laboratorial.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Detectar o RNA do vírus da raiva em diferentes fragmentos de sistema nervoso central pela RT-qPCR.

3.2 Específicos

- Avaliar a carga do vírus da raiva nos diferentes fragmentos de SNC;
- Comparar os resultados obtidos na IFD e na RT-qPCR;
- Comparar os resultados obtidos nos diferentes fragmentos de SNC;
- Contribuir para melhora no diagnóstico da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi realizado com amostras de fragmentos de diferentes porções do SNC de equinos, provenientes do Programa Nacional de Controle de Raiva dos Herbívoros (PNCRH), sob coordenação do Médico Veterinário Fiscal Estadual Agropecuário Fábio Shiroma de Araújo, da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul (IAGRO-MS), encaminhados para diagnóstico no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais e Análise de Alimentos (LADDAN), sob responsabilidade da Médica Veterinária Fiscal Estadual Agropecuária Aline de Oliveira Figueiredo.

Os fragmentos de SNC foram separados em tálamo, cerebelo, córtex, hipocampo e as porções da medula cranial, torácica e lombar; cada fragmento foi acondicionado individualmente em criotubos de 2,0 mL e armazenado posteriormente a -80°C. Além disso, uma porção dos fragmentos também foi acondicionada em criotubos de 2,0 mL contendo 1,0 mL de *RNAlater™ Stabilization Solution* (Ambion, EUA) e armazenado por 24 horas a 4°C e posteriormente a -20°C. Um esquema foi elaborado e encaminhado para os médicos veterinários do serviço veterinário oficial (SVO) para orientar a coleta das amostras (Figura 4). O

soro desses animais também foi coletado para ser utilizado em outros projetos de pesquisa.



Figura 4. Esquema de coleta das amostras de sistema nervoso central de equinos para diagnóstico de raiva. FONTE: elaborado pela autora, 2023.

O diagnóstico, conforme preconizado, foi realizado pela IFD e PB no LADDAN (Laboratório Oficial), bem como pelas técnicas moleculares. Mesmo amostras de equinos positivas na IFD foram analisadas pelas técnicas moleculares, sem a realização da prova biológica para reduzir o número de camundongos utilizados no diagnóstico.

4.1 Imunofluorescência direta

A IFD foi realizada no LADDAN da IAGRO-MS, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Foi realizada avaliação qualitativa e quantitativa do antígeno viral através da observação no microscópio. Foram estabelecidos 6 níveis: 0 quando havia ausência completa da presença do antígeno, 1 (+) para presença rara do antígeno em todos os campos com pouco antígeno, 2 (++) campos negativos com escassez do antígeno, 3 (+++) distribuição homogênea e ainda com áreas negativas, 4 (+++++) distribuição homogênea de

antígenos e sem áreas negativas e 5 (+++++) presença de poeira antigênica e inclusões incontáveis.

4.2 Extração do RNA do vírus da raiva

A extração do RNA viral foi realizada logo após o recebimento das amostras para evitar degradação do ácido nucleico (Figura 5). Inicialmente, foram desprezadas as extremidades dos fragmentos de SNC utilizando materiais estéreis e individuais para cada um deles, a fim de reduzir os riscos de contaminação entre um fragmento e outro. Foram pesados aproximadamente 32 mg de cada tecido e, em seguida, realizada a maceração com o auxílio de uma lâmina de bisturi para cada fragmento. O RNA foi extraído utilizando o *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os *pellets* de RNA foram suspensos em 50 µL de água livre nucleases e armazenados a -80°C.



Figura 5. Ilustração da pesagem e maceração para realização da extração do RNA viral. Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 One-step RT-qPCR

Inicialmente, todas as amostras foram testadas em *pools* dos fragmentos enviados para diagnóstico, e posteriormente, as positivas foram submetidas a uma nova RT-qPCR para cada um dos fragmentos.

A RT-qPCR foi realizada no Laboratório de Virologia (LabVir), FAMEZ, UFMS, no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher

Scientific, MA, EUA). Os *primers* e sonda (Tabela 2) foram utilizados de acordo com o recomendado pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (Lacen-PR), (MINOZZO *et al.*, 2022). Os *primers* têm como alvo a região da nucleoproteína.

Tabela 2. Primers e sonda utilizados no protocolo de one-step RT-qPCR para diagnóstico do vírus da raiva.

Primer	Sequência (5'-3')
LN34F (<i>Forward</i>)	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA
LN34R (<i>Reverse</i>)	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC
LN34 (<i>Probe</i>)	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+ATGGA (BHQ1)

Fonte: adaptado de MINOZZO *et al.* (2022).

A padronização das reações foi realizada com amostras sabidamente positivas para raiva provenientes da IAGRO-MS, utilizando-se as concentrações de 400 nM de primer e 200 nM de sonda. A curva de eficiência da reação apresentou boa performance até a diluição de 10^{-7} . Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram com *C_q* menor que 36.

O mix foi preparado utilizando o kit *KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™* (Sigma-Aldrich, EUA) com a adição de 1 µL de *CXR Reference Dye* (Promega, USA) a cada 500 µL do *mastermix*. Cada reação possuía 10 µL de *mastermix*, 0,8 µL de primer F, 0,8 µL de primer R, 0,4 µL de sonda, 6 µL de água livre de nucleases e 2 µL do RNA alvo, totalizando 20 µL de volume final. As condições de termociclagem foram descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições de temperatura, tempo, ciclos e fases da *one-step* RT-qPCR.

Estágio da PCR	Temperatura	Tempo	Ciclos
Transcrição reversa	50°C	30 minutos	
Inativação da RT	95°C	10 minutos	
Denaturação	95°C	15 segundos	45x
Anelamento/extensão	56°C	45 segundos	

Fonte: elaborado pela autora (2024).

4.4 Distribuição geográfica

As coordenadas geográficas presentes nas fichas de requisição das amostras recebidas pela IAGRO-MS foram utilizadas, respeitando as diretrizes da Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD), para análise da distribuição geográfica da raiva através do software QGIS versão 3.40.1.

4.5 Análise estatística

As análises das frequências de envio de todos os fragmentos das amostras recebidas foram realizadas por meio de estatística descritiva. O coeficiente de Kappa foi utilizado para realizar a análise estatística entre os resultados obtidos na IFD e RT-qPCR e os valores obtidos foram classificados de acordo com o estabelecido por Landis & Koch (LANDIS & KOCH, 1977). Além disso, os resultados da RT-qPCR por fragmento foram avaliados com os testes de análise de variância (ANOVA) e Tukey, com nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* BioStat versão 5.0.

5. RESULTADOS

No período de 2022 a 2024 foram recebidas 33 amostras de equinos, sendo 12 positivas para raiva. Todas as 12 amostras foram positivas na IFD realizada na IAGRO-MS e, visando a redução do uso de camundongos devido ao bem-estar animal, não foi realizada a prova biológica para nenhuma das amostras positivas. Os resultados da RT-qPCR e IFD por fragmento foram agrupados na tabela 4 e 5.

Das 12 amostras positivas recebidas, somente na 01 foram enviados todos os sete fragmentos de SNC solicitados (8,3%) (Figura 6). Da amostra 04 foram enviados 6 de 7 fragmentos (8,3%). Entre as demais amostras, 2 (16,7%) possuíam 5 fragmentos, 4 (33,4%) possuíam 4 fragmentos, 3 (25%) possuíam 3 fragmentos, 1 (8,3%) somente 1 fragmento.

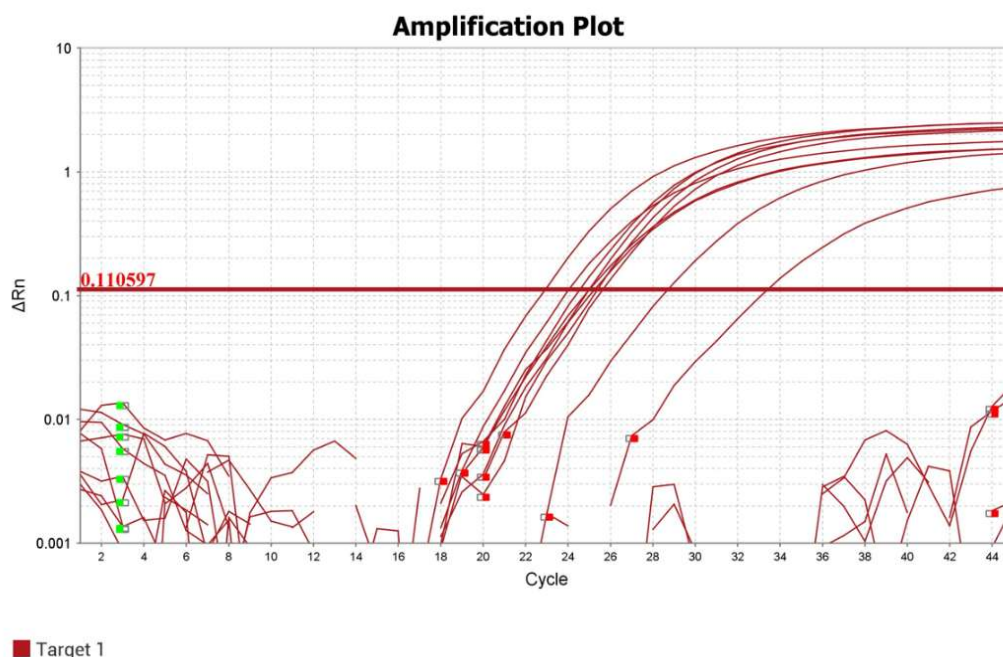


Figura 6. Resultado da RT-qPCR representada através do gráfico de amplificação de todos os fragmentos de sistema nervoso central da amostra 1. Fonte: Arquivo Pessoal.

Nas amostras 01 e 04, a medula lombar (16,7%) apresentou menor Cq quando comparado aos demais fragmentos. Em 5 amostras (41,6%), o córtex apresentou menor Cq , enquanto o tálamo em 2 amostras (16,7%), medula cervical em 2 amostras (16,7%) e o cerebelo em somente 1 amostra (8,3%).

Quanto à condição de recebimento das amostras, devido às condições ambientais e distância entre os municípios e o laboratório de referência, todas as amostras estavam congeladas e somente a amostra 8 estava em estágio avançado de decomposição sendo possível identificar somente os fragmentos de córtex e tálamo.

540 **Tabela 4.** Resultados do Cq obtido através da RT-qPCR nos diferentes fragmentos de SNC de equinos encaminhados para diagnóstico de raiva, com o tempo
541 de início da sintomatologia e o tipo de óbito dos equinos.

Amostra	Tempo (em dias) entre o início dos sintomas e o óbito	Tipo do óbito	Fragmento de SNC						
			Córtex (CX)	Cerebelo (CE)	Tálamo (TA)	Hipocampo (HI)	Medula Cervical (MC)	Medula Torácica (MT)	Medula Lombar (ML)
01	4	Eutanásia	N	33,47	30,47	N	28,9	30,5	25,19
02	1	Morte natural	30,41	NC	N	N	26,87	NC	NC
03	1	Morte natural	24,56	NC	22,12	NC	NC	NC	NC
04	2	Eutanásia	25,46	27,16	25,27	25,58	25,87	NC	24,53
05	6	Eutanásia	26,76	27,84	28,72	NC	28,77	NC	NC
06	5	Morte natural	N	N	28,46	NC	28,12	NC	NC
07	2	Morte natural	30,65	N	NC	NC	33,96	NC	NC
08	2	Morte natural	35,56	N	29,35	N	31,91	NC	NC
09	1	Morte natural	30,48	35,55	NC	NC	35,66	NC	NC
10	2	Morte natural	27,42	35,20	27,57	NC	31,10	NC	NC
11	2	Eutanásia	28,96	26,15	26,92	26,58	28,85	NC	NC
12	2	Morte natural	26,50	36,43	28,50	32,31	33,07	NC	NC

542 N: negativo, Cq > 36; NC: não coletado.

Tabela 5. Resultados da IFD nos diferentes fragmentos de SNC de equinos encaminhados para diagnóstico de raiva.

Amostra	Imunofluorescência direta						
	Córtex	Cerebelo	Tálamo	Hipocampo	Medula cervical	Medula torácica	Medula lombar
1	1	2	2	1	4	3	4
2	2	NC	1	0	3	NC	NC
3	1	NC	1	NC	NC	NC	NC
4	1	2	4	2	2	NC	4
5	2	3	4	NC	4	NC	NC
6	1	1	3	NC	3	NC	NC
7	3	2	NC	NC	2	NC	NC
8	2	1	2	1	2	NC	NC
9	2	2	NC	NC	2	NC	NC
10	2	1	3	NC	2	NC	NC
11	2	3	2	2	2	NC	NC
12	5	4	4	2	3	NC	NC

NC: não coletado

Os animais apresentaram sinais clínicos variáveis como incoordenação, movimentos de pedalagem, paralisia flácida dos membros posteriores, dismetria, depressão, incoordenação, cegueira e agressividade. Nas fichas preenchidas pelo SVO, de acordo com as informações fornecidas pelo responsável pela propriedade, cinco animais haviam sido vacinados com a vacina antirrábica, entretanto não foram obtidas informações sobre o esquema vacinal e a quantidade de doses administradas.

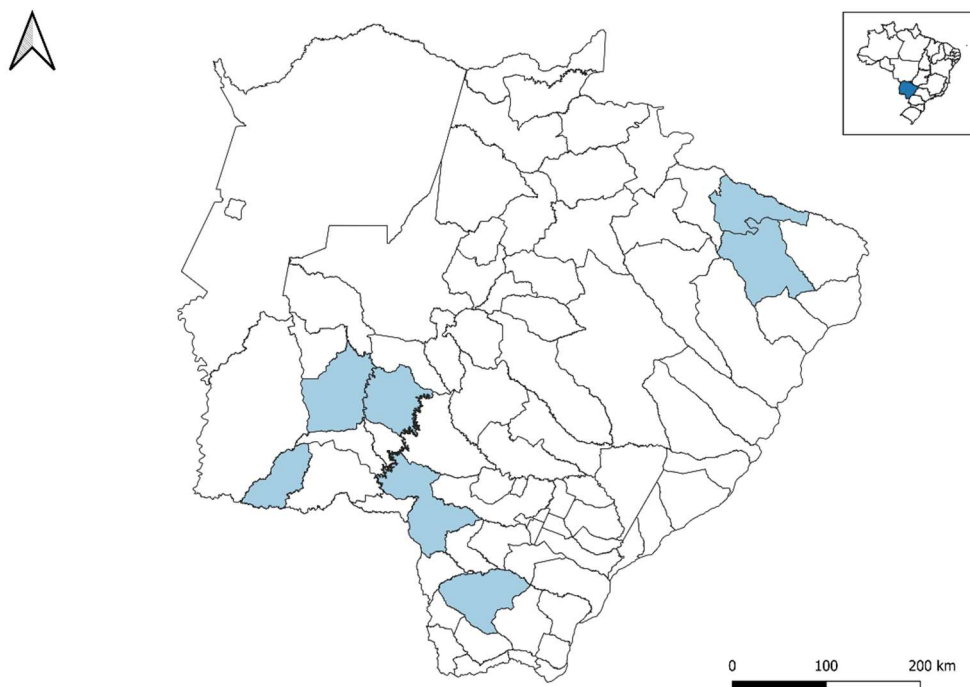


Figura 7. Distribuição das amostras positivas de Mato Grosso do Sul recebidas para realização do projeto de pesquisa. Fonte: elaborado pela autora, 2025.

Quanto ao coeficiente Kappa, os valores obtidos variaram de concordância moderada a concordância alta. O Kappa global foi de 0,64 indicando uma boa concordância geral entre as técnicas. A maior concordância nas técnicas de IFD e RT-qPCR foi observada na medula torácica, seguida da medula cervical, lombar e córtex, sugerindo que as observações do antígeno na IFD e a carga viral dos fragmentos através da RT-qPCR tendem a ser similar. Os resultados cálculos do coeficiente de Kappa foram agrupados na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficiente de Kappa para todos os fragmentos de sistema nervoso central de equinos para as técnicas de IFD e RT-qPCR.

Par de fragmentos	Coeficiente de Kappa	Interpretação
Córtex	0,71	Alta
Cerebelo	0,63	Moderada
Tálamo	0,58	Moderada
Hipocampo	0,67	Moderada
Medula cervical	0,75	Alta
Medula torácica	0,82	Alta
Medula lombar	0,73	Alta

Na comparação das médias de *Cq* entre os fragmentos, a medula lombar apresentou a menor média (24,86), seguida pelo córtex (29,02) e pelo tálamo (29,17). Os fragmentos com maiores médias de *Cq* são cerebelo (34,08) e hipocampo (32,36) (Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio padrão dos *Cq* de cada fragmento de sistema nervoso central das amostras de equinos utilizadas neste estudo.

Fragmento	Média	Desvio padrão
Córtex	29,02	4,07
Cerebelo	34,08	4,02
Tálamo	29,17	5,77
Hipocampo	32,36	6,07
Medula cervical	30,34	3,43
Medula torácica	30,50	0,00
Medula lombar	24,86	0,33

A média e o desvio padrão dos *Cq* dos fragmentos foi utilizada para execução do teste ANOVA de uma via, obtendo um valor de *p* igual a 0,001, ou seja, pelo menos uma das médias de *Cq* dos fragmentos é diferente das demais. No teste de Tukey, houve diferença estatística significativa entre as médias de *Cq* quando comparado cerebelo e a medula lombar, onde a média do primeiro é significativamente maior que a medula lombar, assim como a comparação com o hipocampo, indicando que a carga viral na medula lombar é maior que no cerebelo e hipocampo. Nos demais fragmentos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas.

6. DISCUSSÃO

A raiva em equinos representa um desafio para a saúde pública, especialmente em regiões com grande população equina, como Mato Grosso do Sul, que possui o quarto maior rebanho do país (IBGE, 2024). Os equinos, como sentinelas e hospedeiros terminais, desempenham um papel crucial na vigilância epidemiológica da doença. A detecção rápida e sensível do vírus rábico é essencial

para a implementação de medidas de controle e prevenção, tanto em animais quanto em humanos.

Ao considerar este estudo e seus resultados, observa-se que a detecção do vírus da raiva pela técnica de RT-qPCR foi eficiente e que houve uma variabilidade considerável entre os diferentes fragmentos, sem um padrão único definido de distribuição da carga viral em um determinado fragmento. Essa variabilidade pode estar relacionada a diversos fatores, como o tempo entre o início dos sintomas e o óbito, o tipo de óbito (eutanásia ou morte natural) e cepa viral.

Somente a amostra 1 possuía todos os 7 fragmentos solicitados, dificultando assim a uniformização dos dados obtidos e a análise estatística aprofundada. Nesta amostra, a porção da medula lombar apresentou o menor Cq (25,19), com uma diferença de pelo menos 3,8 Cq , quando comparado aos demais fragmentos de SNC. Isto representa que a porção da medula lombar, nesta amostra, possuía 8 vezes mais carga do vírus que os demais fragmentos de SNC.

Comparando os resultados qualitativos obtidos entre as técnicas de IFD e RT-qPCR demonstraram concordância próxima de 1,0, o que indica concordância perfeita entre as técnicas (BABU *et al.*, 2012). Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos qualiquantitativos comparando ambas as técnicas, diferentemente neste estudo, onde as análises foram realizadas por fragmento de SNC (análise qualiquantitativa). Os valores de Kappa indicam que a concordância entre as técnicas de IFD e RT-qPCR varia de moderada a alta. A maior concordância foi observada na medula torácica, o que pode ser explicado pelo fato de ter sido recebido somente uma amostra contendo este fragmento, sugerindo que a carga viral e a presença do antígeno são similares em ambas as técnicas. Já no cerebelo, tálamo e hipocampo a concordância foi considerada moderada, reforçando a importância de coletar múltiplos fragmentos do SNC para aumentar a chance de detecção do vírus da raiva em equinos. O número de amostras com todos os fragmentos coletados é pequeno, o que pode ter influenciado os resultados.

O diagnóstico da raiva em equinos apresenta algumas peculiaridades que o diferenciam de outras espécies, uma vez que os métodos tradicionais de diagnóstico da raiva, como a imunofluorescência direta (IFD), podem apresentar menor sensibilidade em amostras de equinos. Um estudo realizado por Peixoto *et al.* (2000) demonstrou que a sensibilidade da IFD para amostras de equinos foi

menor do que para amostras de bovinos. Isso pode ser atribuído à menor quantidade de antígeno viral presente nos tecidos nervosos de equinos, especialmente em casos de evolução rápida da doença. Apesar disso, nos equinos estudados neste trabalho, todas as amostras foram positivas na IFD.

A detecção do vírus da raiva pode variar dependendo da técnica diagnóstica utilizada. No estudo de Manjunathareddy *et al.* (2016), a RT-qPCR apresentou maior sensibilidade que a IFD e a RT-PCR convencional para o diagnóstico da raiva em diferentes espécies animais. Hughes *et al.* (2004) também demonstraram a eficácia da RT-qPCR, com uso de sondas para aumentar a especificidade, para a detecção e quantificação do RNA do vírus da raiva em amostras de tecido.

Cappelari *et al.* (2022) investigaram métodos alternativos para confirmar o diagnóstico da raiva, com o objetivo de reduzir o uso de animais, facilitar a coleta e o armazenamento de amostras. Foram avaliados o teste de isolamento viral em cultura de células (RTCIT) e a RT-PCR em comparação com o teste padrão-ouro (IFD e PBT). Os resultados indicaram que o RTCIT apresentou maior sensibilidade (92,5%) em comparação com a IFD, enquanto a RT-PCR teve maior especificidade (92,3%). A combinação de ambos os testes aumentou a sensibilidade, o valor preditivo negativo (VPN) e o coeficiente de Kappa (considerando resultados positivos por RTCIT ou RT-PCR), e a especificidade e o valor preditivo positivo (VPP) (quando ambos os testes foram concordantes). Entretanto, a RT-PCR produz resultados apenas qualitativos, não sendo possível comparar as diferenças na carga viral como nesse estudo.

Não foram encontrados nas principais bases de dados da literatura, trabalhos que utilizem a RT-qPCR para comparar a carga viral nos diferentes fragmentos de tecido do sistema nervoso central de animais. Entretanto, existem trabalhos que comparam as diferenças no padrão das lesões através da imuno-histoquímica. Bassuíno e colaboradores (2016), avaliaram o padrão nos tecidos do sistema nervoso central de sete equinos positivos para raiva e, todos os animais apresentavam lesões na medula espinhal na região lombar e na intumescência lombar, assim a chance de detecção de lesões causadas pela raiva é 3,5 vezes maior quando analisadas as porções da medula espinhal em comparação com as amostras do encéfalo. Assim como observado neste estudo, uma vez que as amostras que possuíam fragmentos de medula lombar apresentaram menor carga viral.

Pedroso *et al.* (2010) utilizaram a imuno-histoquímica para avaliar a distribuição do antígeno rábico em diferentes cortes histológicos do SNC de equídeos, provenientes de medula espinhal cervical, bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo, cerebelo, córtex frontal, córtex parietal, córtex temporal, córtex occipital e hipocampo. Houve imunomarcção mais evidente no córtex temporal, córtex occipital e medula espinhal cervical. Wisser *et al.* (2020) utilizaram amostras de bovinos e encontraram maior intensidade de lesões inflamatórias no bulbo, seguido pelo colículo e tálamo, enquanto os corpúsculos de Negri foram mais prevalentes no cerebelo. Essa diferença pode ser explicada pelos métodos de análise distintos e pelas diferentes regiões do SNC avaliadas.

Em comparação com a cultura de tecidos como teste confirmatório para amostras de equinos, a porção do tronco encefálico possuía maior positividade, seguida do hipocampo, e do cerebelo e córtex na mesma proporção (TORQUATO *et al.*, 2020). Similar ao relatado neste trabalho, onde as duas amostras que possuíam fragmentos de medula lombar, apresentavam menor Cq quando comparado aos demais.

Ao comparar com os métodos diagnósticos preconizados pela Organização Mundial da Saúde e a Organização Mundial de Saúde Animal, a RT-qPCR oferece bons resultados em poucas horas e permite a quantificação da carga viral. Enquanto a IFD, em conjunto com a prova biológica, necessita de tempo de diagnóstico de até 30 dias para que os camundongos inoculados passem pelo período de incubação do vírus, apresentem sinais clínicos, e tenham o sistema nervoso avaliado em uma nova IFD, com resultados qualitativos. Além disso, a RT-qPCR dispensa o uso de espaço extra para manutenção dos camundongos inoculados. Vale ressaltar que a quantificação da carga viral das amostras encaminhadas para diagnóstico, não são aplicadas na rotina do diagnóstico, somente para pesquisa, uma vez que o resultado qualitativo já pode respaldar a tomada de ações de profilaxia e controle da raiva.

7. CONCLUSÃO

A técnica de RT-qPCR demonstrou ser eficiente para a detecção do vírus da raiva em equinos, oferecendo um diagnóstico mais sensível e rápido do que os métodos tradicionais, como a prova biológica (PB). A possibilidade de quantificação

da carga viral permite uma análise mais detalhada da distribuição do vírus no sistema nervoso central (SNC) dos equinos.

Não houve um padrão único de distribuição da carga viral no SNC dos equinos estudados. Algumas amostras apresentaram maior carga viral na medula lombar, enquanto outras tiveram maior concentração no córtex, tálamo ou cerebelo. Esses achados reforçam a importância de coletar múltiplos fragmentos do SNC para um diagnóstico preciso.

Os resultados indicam a necessidade de revisar os protocolos de coleta de amostras para diagnóstico da raiva em equinos, considerando que todos os fragmentos de SNC devem ser encaminhados para aumentar a taxa de detecção do vírus. A inclusão da RT-qPCR como ferramenta para diagnóstico confirmatório pode reduzir a necessidade de métodos invasivos e do uso de animais na prova biológica. A PCR em tempo real também pode ser utilizada em amostras em decomposição e autolisadas, diferentemente da prova biológica.

Além disso, o aprimoramento do diagnóstico laboratorial pode fortalecer os programas de vigilância da raiva, permitindo respostas mais rápidas para controle da doença e prevenção de surtos. Reduzir o tempo necessário para a confirmação da raiva em equinos pode melhorar a tomada de decisões sobre bloqueio vacinal em herbívoros, animais de companhia e realização de profilaxia pós-exposição em pessoas que estiverem envolvidas em acidentes com mordedura, arranhadura ou lambadura nos animais infectados.

8. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

A raiva é uma doença letal e pode gerar grandes prejuízos econômicos para a saúde pública, especialmente em regiões como Mato Grosso do Sul, onde há um grande rebanho equestre. O uso de métodos diagnósticos mais rápidos e precisos podem evitar perdas financeiras uma vez que as estratégias de mitigação relacionadas à profilaxia e controle da doença precisam ser iniciadas rapidamente a fim de evitar a morte de outros animais. A pesquisa pode contribuir para a otimização de estratégias de vigilância sanitária, diminuindo gastos públicos e privados no manejo da doença. Além disso, pode impactar diretamente na prevenção da doença em humanos que tiveram contato com os animais suspeitos.

A substituição de técnicas tradicionais, como a prova biológica em camundongos, pelo uso de RT-qPCR, torna o diagnóstico mais rápido, sensível e

728 específico. A pesquisa contribui para a inovação no diagnóstico laboratorial da
729 raiva, podendo levar à revisão de protocolos para melhor eficácia na detecção do
730 vírus. Estudos envolvendo a distribuição da carga viral em diferentes segmentos do
731 sistema nervoso podem orientar novos critérios para a escolha dos fragmentos
732 ideais a serem coletadas, melhorando a sensibilidade da metodologia diagnóstica,
733 podendo impactar políticas públicas referentes as recomendações para o
734 diagnóstico da raiva.

9. REFERÊNCIAS

- ACHKAR, S. M.; FERNANDES, E. R.; CARRIERI, M. L. et al. Sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.211-218, 2010.
- BANYARD, A.C.; FOOKS, A.R. Rabies Life Cycle, Transmission and Pathogenesis. In: ERTL, H. (Ed.). **Rabies and Rabies Vaccines**. Cham: Springer, 2020.
- BASSUINO, D.M.; KONRADT, G.; CRUZ, R.A. et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.28, n.4, p.455-460, 2016.
- BONES, V. C; MOLENTO, C. F. M. Alternativa ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.
- BRASIL. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 23p.
- _____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**. Brasília: MAPA, 2009. 124p.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva. In: Brasil (eds.). **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, BRASIL: Editora do Ministério da Saúde, p.989-1018, 2024.
- CAPPELARI, B. E.; GODINHO, F. M. S; SILVA, A. G. et al. Laboratory validation of confirmatory tests for rabies diagnosis: Approaches to reduce animal use and to facilitate sample collection. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.69, n.6, p.1-8, 2022.
- CENTOAMORE, N. H. F.; CHIERATO, M. E. R.; SILVEIRA, V. B. 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.
- DA SILVA, D.A.; PICCININI, R. S.; FACCINI, J. L.H. Os morcegos hematófagos como parasitas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p.93-95, 1997.
- DIAS, R.A.; NOGUEIRA FILHO, V.S; GOULART, C.S. et al. Modelo de risco para circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.30, n.4, p.370–376, 2011.
- FLORES, E. F. Rhaboviridae. In: **Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 3. ed. UFSM, 2017 1133p.

GREEN, S.L; SMITH, L.L; VERNAU, W. et al. Rabies in horses: 21 cases (1970-1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.8, p.1133-1137, 1992.

HUGHES, G. J. et al. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.299-306, 2004.

IBEQUI – INSTITUTO BRASILEIRO DE EQUIDOCULTURA. **O Brasil dos Cavalos - Edição 1**. 2023. Disponível em: <<https://ibequi.com/ibequi/f/“o-brasil-dos-cavalos”-é-destaque-da-1ª-edição-da-revista-ibequi>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2024.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabela 3939 – Efetivo por tipo de rebanho – SIDRA**. 2024. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2024.

JACKSON, Alan C. Atualização sobre a patogênese da raiva. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.1, n.1, p.167-172, 2010.

KOBAYASHI, Y.; UUKI, Y.; ITOU, T. et al. Evolutionary history of dog rabies in Brazil. **The Journal of General Virology**, v.92, n.1, p.85-90, 2011.

KOTTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva – Aspectos gerais e clínicos**. 8 ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. 57p.

LANDIS, J. R.; GARY G. K. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v.33, n.1.1977, p.159–74, 1977.

LYLES; RUPPRECHT. In: KNIPE e HOWLEY. **Fields Virology**, p. 1385-1389, 2007.

BABU, R. P.; MANOHARAN, S.; RAMADASS, P.; CHANDRAN, N. D. J. Evaluation of RT-PCR assay for routine laboratory diagnosis of rabies in post mortem brain samples from different species of animals. **Indian Journal of Virology**, v.23, n.3, p.392-396, 2012.

MANJUNATHREDDY, G. B.; SUMANA, K.; YOGISHARADHYA, R. et al. Diagnosis of animal rabies: comparison of direct fluorescent antibody test (dFAT), reverse transcriptase -PCR and real-time PCR. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.4, n.Spl-3-ADPCAD, p.S69-S74, 2016.

MINOZZO, G.A.; CORONA, T.F.; DA CRUZ, E.C.R. et al. Novel duplex RT-qPCR for animals rabies surveillance. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.69, n.5, p.e2261-e2267, 2022.

PEDROSO, P. M. O.; COLODEL, E. M; GOMES, D. C. et al. Aspectos clínico-patológicos e imuno-histoquímicos de equídeos infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.909-914, 2010.

PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R.V. et al. Rabies Laboratory Diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.1, p.72-75, 2000.

RIBEIRO, J.; STAUDACHER, C.; MARTINS, C.M. et al. Bat rabies surveillance and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.1, p.1–8, 2018.

SAZIMA, I. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia**, n.3, p.97-120, 1978.

SILVA, R. A.; SILVA, N. M.; MENEZES, P.R.V. Ocorrência do vírus da raiva na medula e no bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.9, n.7, p.29-31, 1974.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR handbook**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <thermofisher.com/qpcr>. Acesso em: 02 fev. 2025.

TORQUATO, R. B. C.; IAMAMOTO, K.; FERNANDES, E. R. et al. Detection of rabies virus antigen by the indirect rapid immunohistochemistry test in equines and comparisons with other diagnostic techniques. **Zoonoses Public Health**, v.67, n.6, p.1-7, 2020.

WISSER, C. S.; FERNANDES, M. E. S.; MELCHIORETTO, E. et al. Cattle rabies: the effect of clinical evolution, viral genetic lineage, and viral load on the severity of histological lesions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.40, n.4, p.227-233, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): RUPPRECHT, C.E; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 5ª edição. Geneva: World Health Organization, 2018. Volume 2. 217p.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). MULLER, T. Rabies (Infection with rabies virus and other lyssaviruses. In: WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH) (ed.). **Terrestrial Manual**. França: WOAH, p. 1-38, 2023.