



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

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

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

34 **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.

69 1. INTRODUÇÃO

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

76 Mesmo com o avanço da tecnologia e o desenvolvimento de novas
77 ferramentas para realização de atividades pecuárias e agrícolas, o cavalo continua
78 sendo de grande importância para lida (trabalho), esporte, lazer e criação (BRASIL,
79 2016). De outro lado, os equinos são acometidos por diversas encefalites fatais,
80 sendo a raiva a enfermidade neurológica de maior importância nessa espécie.
81 Assim, é necessário que seja realizado diagnóstico etiológico sensível e rápido para
82 vigilância epidemiológica da doença, realização de intervenções quanto à
83 vacinação de herbívoros suscetíveis e tratamento pós-exposição humana,
84 avaliando possíveis falhas das técnicas diagnósticas e análises de informações
85 obtidas nos casos suspeitos e confirmados.

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

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

103 (cachorro-do-mato) e outra em *Callithrix jacchus* (sagui-de-tufo-branco) (BRASIL,
104 2024).

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

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

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

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

135

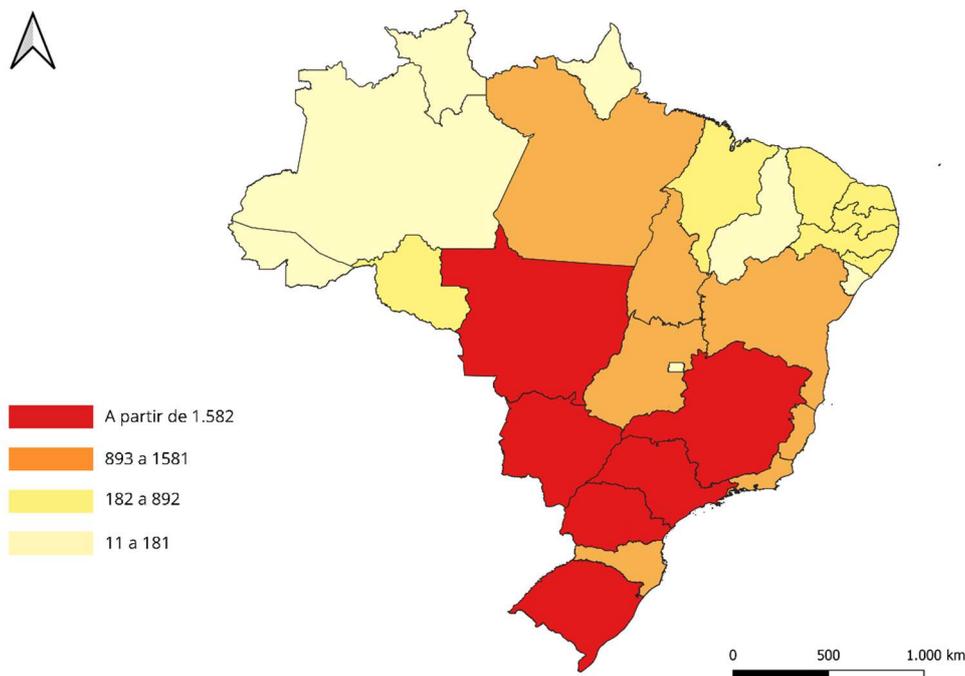
136 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

137 2.1 Histórico e ocorrência da doença

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

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

156 No Brasil, no período de 1986 a outubro de 2024, foram registrados 797
157 casos de raiva humana, sendo 527 transmitidos por cães e 270 por outras espécies.
158 O último caso de raiva humana transmitido por cão com variante canina (AgV1) foi
159 em 2015 no município de Corumbá localizado no Mato Grosso do Sul. No período
160 de 1999 a 2023, foram registrados no Brasil 52.071 casos de raiva animal e destes,
161 2.237 ocorreram em Mato Grosso do Sul (Figura 1). Quanto aos dados por espécie
162 animal, no período de 1999 a 2023 em Mato Grosso do Sul, 1965 casos foram
163 registrados em bovinos, 131 em equinos, 95 em caninos, 43 em animais silvestres,
164 2 em ovinos e 1 em felinos (BRASIL, 2024b; MAPA, 2024).



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

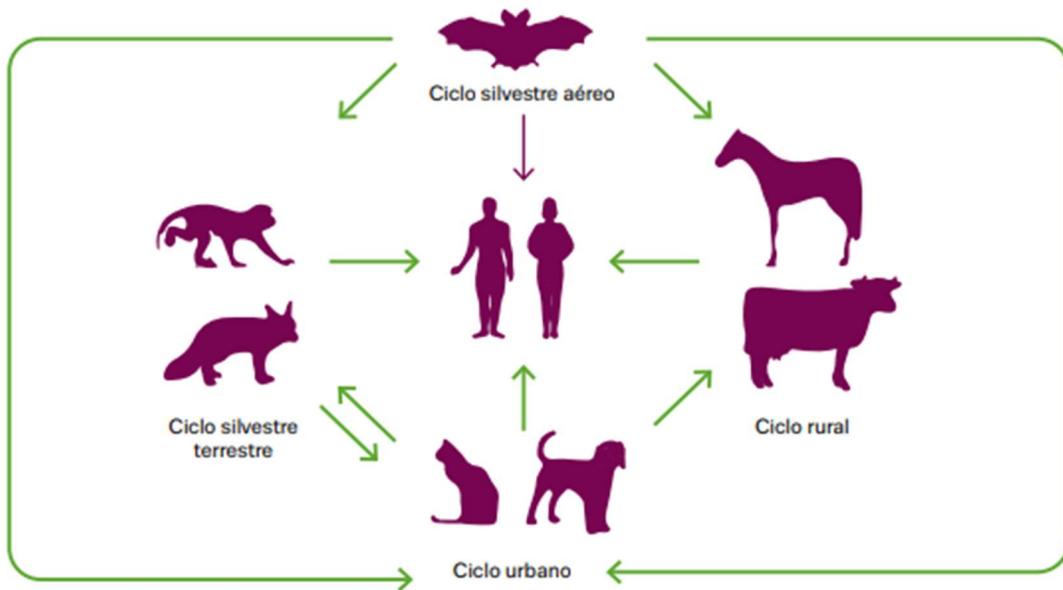
171

172 2.2 Etiologia e patogenia

173 A raiva é uma antropozoonose causada pelo *L. rabies*, gênero *Lyssavirus*,
 174 família *Rhabdoviridae*, e trata-se de uma encefalomielite aguda, progressiva e fatal
 175 em quase 100% dos casos, configurando um problema de saúde pública com
 176 elevado custo social e econômico. Acomete os mamíferos e sua transmissão
 177 ocorre, principalmente, através da saliva de um animal infectado pela mordedura,
 178 arranhadura e/ou lambedura. A transmissão por membranas mucosas, como olhos,
 179 nariz e boca, e por aerossóis também já foram relatadas na literatura (BRASIL,
 180 2008; BRASIL, 2009; BRASIL, 2024; ICTV, 2024).

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

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



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

191

192 A espoliação em equinos por *D. rotundus* ocorre geralmente na região da
193 escápula, cabeça e pescoço, sendo explicada por maior facilidade de apreensão já
194 que usam a crina para sustentação (SAZIMA, 1978). A mordedura é feita por meio
195 de dentes incisivos, sua saliva contém substância anticoagulante para facilitar a
196 alimentação contínua, realizada por lambedura, durante o parasitismo. Os equinos
197 também podem transmitir para os seres humanos. (DA SILVA *et al.*, 1997; BRASIL,
198 2024).

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

210 domésticos; média de 45 dias nos humanos; e indefinido em quirópteros (BRASIL,
211 2008; BRASIL, 2024).

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

224

225 2.2 Genoma e virologia

226 O vírus da raiva (RABV), pertence a ordem *Mononegavirales*, família
227 *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Quanto à sua morfologia, apresenta formato
228 de projétil com dimensões variando entre 60-110 nanômetros de diâmetro e 130-
229 250 nanômetros de comprimento (Figura 3). Sua estrutura é composta por um
230 nucleocapsídeo helicoidal interno, de aproximadamente 50 nanômetros de
231 diâmetro, e um envelope lipídico; a membrana possui de 300 a 400 projeções em
232 formato de espícula compostas pela da proteína G, essenciais para a entrada do
233 vírus na célula hospedeira (HUMMELER *et al.*, 1967; GAUDIN *et al.*, 1992;
234 WHELAN & BLOYET, 2007; ICTV, 2024).

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244



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

246

247 Apresenta um genoma de aproximadamente 12 Kb, RNA não segmentado de
248 fita simples e sentido negativo, composto por cinco proteínas com propriedades
249 antigênicas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M),
250 glicoproteína (G) e RNA-polimerase RNA-dependente (L). A glicoproteína (G) é
251 responsável pela recepção e fusão do envelope do vírus RABV na superfície da
252 célula do hospedeiro e podem sofrer rearranjos durante este processo, promovendo
253 a resposta patogênica. A proteína M (matriz), interliga o envelope e o
254 nucleocapsídeo. A nucleoproteína (N) é responsável por encapsular o RNA viral, o
255 componente essencial para sua síntese uma vez que a polimerase utiliza somente
256 o genoma com capsídeo como molde. A proteína L (proteína polimerase) e proteína
257 P (fosfoproteína) realizam todas as atividades catalíticas necessária para que
258 ocorra a transcrição, replicação do genoma, transporte axoplasmático e a síntese
259 do RNA (WHELAN & BLOYET, 2007; KOTAIT *et al.*, 2009; FLORES, 2017; ICTV,
260 2024).

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

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

272

273 2.3 Diagnóstico

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

279 O método laboratorial padrão ouro para diagnóstico da raiva é a
280 imunofluorescência direta (IFD) aliada à prova biológica (PB) através da inoculação
281 intracerebral em camundongos (BRASIL, 2008). Entretanto, Peixoto *et al.* (2000),
282 demonstraram menor sensibilidade da IFD a partir de amostras equinas quando
283 comparada a outras espécies. Também existem outras técnicas diagnósticas como
284 isolamento viral em camundongos (IVC) ou isolamento viral em cultivo celular
285 (IVCC), exame histopatológico, técnicas de biologia molecular como reação em
286 cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (BRASIL, 2008; WHO
287 2018; WOA, 2023), sendo as técnicas moleculares as mais promissoras
288 atualmente.

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

296 A realização da prova biológica (PB) é necessária para confirmação do
297 diagnóstico dado pela IFD. A técnica consiste na inoculação intracerebral em
298 camundongos (MIT) com suspensão preparada a partir de fragmento de tecido de
299 SNC de animais suspeitos com diluente de vírus. O animal de eleição para o
300 isolamento é o camundongo da espécie *Mus musculus* (camundongo albino suíço),
301 por sua elevada sensibilidade ao vírus rábico. O camundongo utilizado deve ser de
302 boa procedência e apresentar bom estado sanitário, com idade e peso adequados.
303 Para realização da PB são necessários de 8 a 10 camundongos por amostra
304 recebida, com 21 dias de idade e pesando entre 11 a 14g (MAPA, 2008; WHO
305 2018).

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

313 2018). Caso ocorram sintomas ou óbito a partir do 5º dia da inoculação, o sistema
314 nervoso do camundongo é coletado para realização de um novo teste IFD para
315 confirmação do diagnóstico (CORONA, 2016). Por isso, métodos alternativos ao
316 uso de animais, como a inoculação viral em cultivo celular ou métodos de biologia
317 molecular, são mais adequados em termos éticos e de bem-estar animal evitando
318 o sofrimento desnecessário, sendo gradativamente implantados nos laboratórios
319 diagnósticos e apresentam bons resultados quando comparados às técnicas IFD e
320 PB em camundongos (BONES; MOLENTO, 2012).

321

322 2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

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

335 Uma das principais vantagens da PCR convencional é a simplicidade e baixo
336 custo, entretanto, não permite a quantificação do produto amplificado. A Reação
337 em Cadeia da Polimerase por Tempo Real (qPCR) é uma evolução da PCR
338 convencional, permitindo a quantificação do DNA alvo em tempo real durante o
339 processo de amplificação, sendo independente de métodos pós-PCR (Tabela 1),
340 como a eletroforese em gel, para detectar os produtos amplificados, podendo ser
341 realizada em uma única reação minimizando o risco de contaminação (HEID *et al.*,
342 1996; BUSTIN *et al.*, 2009).

343

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>C_q</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

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

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

369

370 2.5 Importância de coletar diferentes fragmentos de sistema nervoso central

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

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

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

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

392

393 **3. OBJETIVOS**

394 3.1 Geral

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

397

398 3.2 Específicos

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

403

404 **4. MATERIAL E MÉTODOS**

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

413 Os fragmentos de SNC foram separados em tálamo, cerebelo, córtex,
414 hipocampo e as porções da medula cranial, torácica e lombar; cada fragmento foi
415 acondicionado individualmente em criotubos de 2,0 mL e armazenado
416 posteriormente a -80°C. Além disso, uma porção dos fragmentos também foi
417 acondicionada em criotubos de 2,0 mL contendo 1,0 mL de *RNAlater™ Stabilization*
418 *Solution* (Ambion, EUA) e armazenado por 24 horas a 4°C e posteriormente a -
419 20°C. Um esquema foi elaborado e encaminhado para os médicos veterinários do
420 serviço veterinário oficial (SVO) para orientar a coleta das amostras (Figura 4). O

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



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

425

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

431

432 4.1 Imunofluorescência direta

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

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

442

443 4.2 Extração do RNA do vírus da raiva

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

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464



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

467

468 4.3 One-step RT-qPCR

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

472

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

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

477

478 **Tabela 2.** Primers e sonda utilizados no protocolo de one-step RT-qPCR para diagnóstico do vírus
479 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)

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

481

482 A padronização das reações foi realizada com amostras sabidamente
483 positivas para raiva provenientes da IAGRO-MS, utilizando-se as concentrações de
484 400 nM de primer e 200 nM de sonda. A curva de eficiência da reação apresentou
485 boa performance até a diluição de 10^{-7} . Foram consideradas positivas as amostras
486 que amplificaram com *C_q* menor que 36.

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

493

494 **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	

495 Fonte: elaborado pela autora (2024).

496

497

498

499 4.4 Distribuição geográfica

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

504

505 4.5 Análise estatística

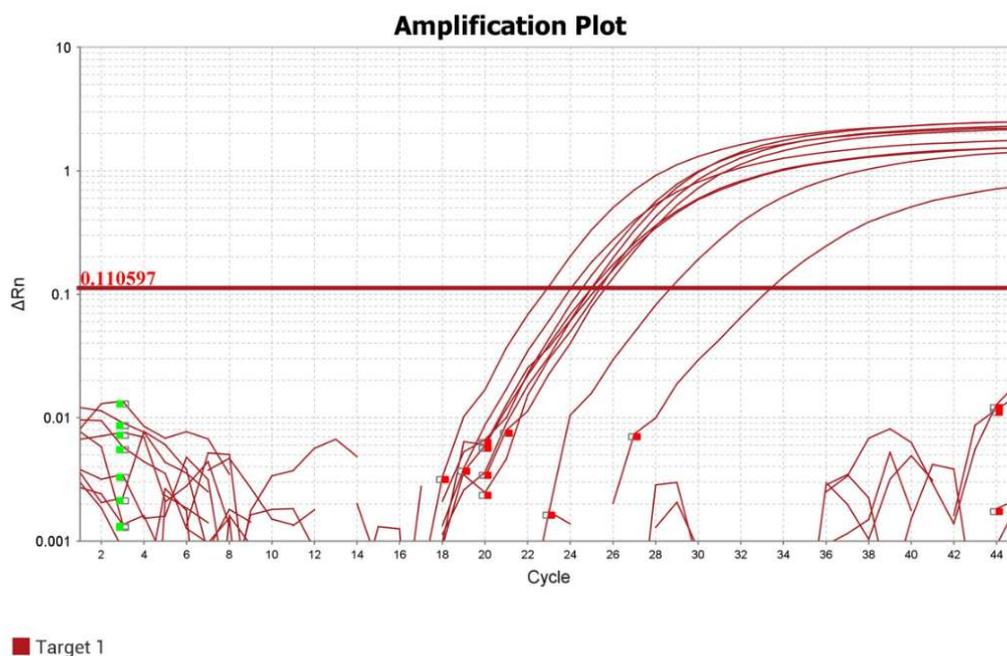
506 As análises das frequências de envio de todos os fragmentos das amostras
507 recebidas foram realizadas por meio de estatística descritiva. O coeficiente de
508 Kappa foi utilizado para realizar a análise estatística entre os resultados obtidos na
509 IFD e RT-qPCR e os valores obtidos foram classificados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

514

515 **5. RESULTADOS**

516 No período de 2022 a 2024 foram recebidas 33 amostras de equinos, sendo
517 12 positivas para raiva. Todas as 12 amostras foram positivas na IFD realizada na
518 IAGRO-MS e, visando a redução do uso de camundongos devido ao bem-estar
519 animal, não foi realizada a prova biológica para nenhuma das amostras positivas.
520 Os resultados da RT-qPCR e IFD por fragmento foram agrupados na tabela 4 e 5.

521 Das 12 amostras positivas recebidas, somente na 01 foram enviados todos
522 os sete fragmentos de SNC solicitados (8,3%) (Figura 6). Da amostra 04 foram
523 enviados 6 de 7 fragmentos (8,3%). Entre as demais amostras, 2 (16,7%) possuíam
524 5 fragmentos, 4 (33,4%) possuíam 4 fragmentos, 3 (25%) possuíam 3 fragmentos,
525 1 (8,3%) somente 1 fragmento.



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

530

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

535 Quanto à condição de recebimento das amostras, devido às condições
 536 ambientais e distância entre os municípios e o laboratório de referência, todas as
 537 amostras estavam congeladas e somente a amostra 8 estava em estágio avançado
 538 de decomposição sendo possível identificar somente os fragmentos de córtex e
 539 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.

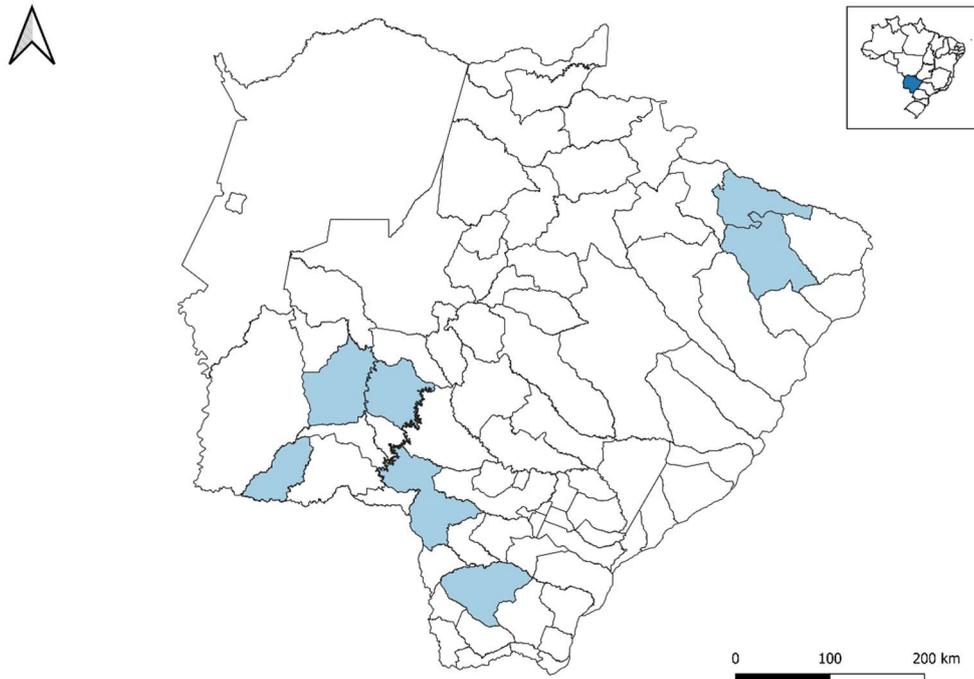
543 **Tabela 5.** Resultados da IFD nos diferentes fragmentos de SNC de equinos encaminhados para
 544 diagnóstico de raiva.

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

545 NC: não coletado

546

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



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

557

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

565

566 **Tabela 6.** Coeficiente de Kappa para todos os fragmentos de sistema nervoso central de equinos
 567 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

568

569 Na comparação das médias de *Cq* entre os fragmentos, a medula lombar
570 apresentou a menor média (24,86), seguida pelo córtex (29,02) e pelo tálamo
571 (29,17). Os fragmentos com maiores médias de *Cq* são cerebelo (34,08) e
572 hipocampo (32,36) (Tabela 7).

573

574 **Tabela 7.** Média e desvio padrão dos *Cq* de cada fragmento de sistema nervoso central das
575 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

576

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

586

587 **6. DISCUSSÃO**

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

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

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

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

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

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

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

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

637 Cappelari *et al.* (2022) investigaram métodos alternativos para confirmar o
638 diagnóstico da raiva, com o objetivo de reduzir o uso de animais, facilitar a coleta e
639 o armazenamento de amostras. Foram avaliados o teste de isolamento viral em
640 cultura de células (RTCIT) e a RT-PCR em comparação com o teste padrão-ouro
641 (IFD e PBT). Os resultados indicaram que o RTCIT apresentou maior sensibilidade
642 (92,5%) em comparação com a IFD, enquanto a RT-PCR teve maior especificidade
643 (92,3%). A combinação de ambos os testes aumentou a sensibilidade, o valor
644 preditivo negativo (VPN) e o coeficiente de Kappa (considerando resultados
645 positivos por RTCIT ou RT-PCR), e a especificidade e o valor preditivo positivo
646 (VPP) (quando ambos os testes foram concordantes). Entretanto, a RT-PCR produz
647 resultados apenas qualitativos, não sendo possível comparar as diferenças na
648 carga viral como nesse estudo.

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

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

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

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

689

690 **7. CONCLUSÃO**

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

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

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

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

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

715

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

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

726 A substituição de técnicas tradicionais, como a prova biológica em
727 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.

735 **9. REFERÊNCIAS**

- 736 ACHKAR, S. M.; FERNANDES, E. R.; CARRIERI, M. L. et al. Sensibilidade da
737 técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de
738 bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa**
739 **Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.211-218, 2010.
740
- 741 BANYARD, A.C.; FOOKS, A.R. Rabies Life Cycle, Transmission and
742 Pathogenesis. In: ERTL, H. (Ed.). **Rabies and Rabies Vaccines**. Cham: Springer,
743 2020.
744
- 745 BASSUINO, D.M.; KONRADT, G.; CRUZ, R.A. et al. Characterization of spinal
746 cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling.
747 **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.28, n.4, p.455-460, 2016.
748
- 749 BONES, V. C; MOLENTO, C. F. M. Alternativa ao uso de animais de laboratório
750 no Brasil. **Veterinária em foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.
751
- 752 BRASIL. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Brasília: Ministério da
753 Saúde, 2008. 23p.
754
- 755 _____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva**
756 **dos herbívoros**. Brasília: MAPA, 2009. 124p.
757
- 758 _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva. In: Brasil
759 (eds.). **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, BRASIL: Editora do Ministério da
760 Saúde, p.989-1018, 2024.
761
- 762 CAPPELARI, B. E.; GODINHO, F. M. S; SILVA, A. G. et al. Laboratory validation
763 of confirmatory tests for rabies diagnosis: Approaches to reduce animal use and to
764 facilitate sample collection. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.69, n.6,
765 p.1-8, 2022.
766
- 767 CENTOAMORE, N. H. F.; CHIERATO, M. E. R.; SILVEIRA, V. B. et al.
768 Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in
769 clinically suspected cattle in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v.283,
770 p.113918, 2020.
771
- 772 DA SILVA, D.A.; PICCININI, R. S.; FACCINI, J. L.H. Os morcegos hematófagos
773 como parasitas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p.93-
774 95, 1997.
775
- 776 DIAS, R.A.; NOGUEIRA FILHO, V.S; GOULART, C.S. et al. Modelo de risco para
777 circulação do vírus da raiva em herbívoros no Estado de São Paulo, Brasil.
778 **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.30, n.4, p.370–376, 2011.
779
- 780 FLORES, E. F. Rhaboviridae. In: **Virologia Veterinária: virologia geral e**
781 **doenças víricas**. 3. ed. UFSM, 2017 1133p.
782

783 GREEN, S.L.; SMITH, L.L.; VERNAU, W. et al. Rabies in horses: 21 cases (1970-
784 1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.8,
785 p.1133-1137, 1992.
786
787 HUGHES, G. J. et al. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus
788 RNA: influence of sequence variation and application to quantification of viral
789 loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.299-306, 2004.
790
791 IBEQUI – INSTITUTO BRASILEIRO DE EQUIDOCULTURA. **O Brasil dos**
792 **Cavalos - Edição 1**. 2023. Disponível em: <[https://ibequi.com/ibequi/f/“o-brasil-
794 dos-cavalos”-é-destaque-da-1ª-edição-da-revista-ibequi](https://ibequi.com/ibequi/f/“o-brasil-
793 dos-cavalos”-é-destaque-da-1ª-edição-da-revista-ibequi)>. Acesso em: 03 de
795 dezembro de 2024.
796
797 IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabela 3939**
798 **– Efetivo por tipo de rebanho – SIDRA**. 2024. Disponível em:
799 <<https://sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2024.
800
801 JACKSON, Alan C. Atualização sobre a patogênese da raiva. **Rev Pan-Amaz**
802 **Saude**, v.1, n.1, p.167-172, 2010.
803
804 KOBAYASHI, Y.; UUKI, Y.; ITOU, T. et al. Evolutionary history of dog rabies in
805 Brazil. **The Journal of General Virology**, v.92, n.1, p.85-90, 2011.
806
807 KOTTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. **Raiva – Aspectos gerais e**
808 **clínicos**. 8 ed. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. 57p.
809
810 LANDIS, J. R.; GARY G. K. The Measurement of Observer Agreement for
811 Categorical Data. **Biometrics**, v.33, n.1.1977, p.159–74, 1977.
812
813 LYLES; RUPPRECHT. In: KNIPE e HOWLEY. **Fields Virology**, p. 1385-1389,
814 2007.
815
816 BABU, R. P.; MANOHARAN, S.; RAMADASS, P.; CHANDRAN, N. D. J.
817 Evaluation of RT-PCR assay for routine laboratory diagnosis of rabies in post
818 mortem brain samples from different species of animals. **Indian Journal of**
819 **Virology**, v.23, n.3, p.392-396, 2012.
820
821 MANJUNATHREDDY, G. B.; SUMANA, K.; YOGISHARADHYA, R. et al.
822 Diagnosis of animal rabies: comparison of direct fluorescent antibody test (dFAT),
823 reverse transcriptase -PCR and real-time PCR. **Journal of Experimental Biology**
824 **and Agricultural Sciences**, v.4, n.Spl-3-ADPCIAD, p.S69-S74, 2016.
825
826 MINOZZO, G.A.; CORONA, T.F.; DA CRUZ, E.C.R. et al. Novel duplex RT-qPCR
827 for animals rabies surveillance. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.69,
828 n.5, p.e2261-e2267, 2022.
829
830 PEDROSO, P. M. O.; COLODEL, E. M; GOMES, D. C. et al. Aspectos clínico-
831 patológicos e imuno-histoquímicos de equídeos infectados pelo vírus da raiva.
832 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.909-914, 2010.

833 PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R.V. et al. Rabies
834 Laboratory Diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. **Brazilian**
835 **Journal of Microbiology**, v.31, n.1, p.72-75, 2000.
836

837 RIBEIRO, J.; STAUDACHER, C.; MARTINS, C.M. et al. Bat rabies surveillance
838 and risk factors for rabies spillover in an urban area of Southern Brazil. **BMC**
839 **Veterinary Research**, v.14, n.1, p.1–8, 2018.
840

841 SAZIMA, I. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago
842 *Desmodus rotundus*. **Boletim de Zoologia**, n.3, p.97-120, 1978.
843

844 SILVA, R. A.; SILVA, N. M.; MENEZES, P.R.V. Ocorrência do vírus da raiva na
845 medula e no bulbo de equinos na doença natural e sua ausência nas diferentes
846 regiões do sistema nervoso central e outros tecidos. **Pesquisa Agropecuária**
847 **Brasileira**, v.9, n.7, p.29-31, 1974.
848

849 THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR handbook**. [S. l.: s. n.], 2016.
850 Disponível em: <thermofisher.com/qpcr>. Acesso em: 02 fev. 2025.
851

852 TORQUATO, R. B. C.; IAMAMOTO, K.; FERNANDES, E. R. et al. Detection of
853 rabies virus antigen by the indirect rapid immunohistochemistry test in equines and
854 comparisons with other diagnostic techniques. **Zoonoses Public Health**, v.67,
855 n.6, p.1-7, 2020.
856

857 WISSER, C. S.; FERNANDES, M. E. S.; MELCHIORETTO, E. et al. Cattle rabies:
858 the effect of clinical evolution, viral genetic lineage, and viral load on the severity of
859 histological lesions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.40, n.4, p.227-233, 2020.
860

861 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): RUPPRECHT, C.E; FOOKS, A. R.;
862 ABELA-RIDDER, B (eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 5ª edição. Geneva:
863 World Health Organization, 2018. Volume 2. 217p.
864

865 WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). MULLER, T. Rabies
866 (Infection with rabies virus and other lyssaviruses. In: WORLD ORGANISATION
867 FOR ANIMAL HEALTH (WOAH) (ed.). **Terrestrial Manual**. França: WOA, p. 1-
868 38, 2023.