



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA

TAYNÁ GIOVANA ALANIZ

RAIVA ANIMAL: DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS UNESP FMVA

Araçatuba
2026

TAYNÁ GIOVANA ALANIZ

RAIVA ANIMAL: DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS UNESP FMVA

Trabalho de Conclusão de Residência
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina
Veterinária de Araçatuba, para obtenção
do título de Residente em Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Pública.

Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Marinho

Araçatuba

2026

A319r Alaniz, Tayná Giovana.
Raiva animal: diagnósticos laboratoriais UNESP FMVA / Tayná Giovana Alaniz. - Araçatuba, 2026
32 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Medicina Veterinária) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária,
Araçatuba
Orientadora: Márcia Marinho

1. Raiva animal. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. Imunofluorescência direta.
4. Vigilância epidemiológica. 5. Saúde Única. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa, desenvolvida no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP–FMVA, apresenta impacto relevante para a sociedade. Sob a perspectiva social e da saúde pública, o estudo contribui para o enfrentamento de uma doença grave e fatal, auxiliando na proteção da saúde humana e animal por meio do diagnóstico laboratorial preciso e oportuno. No âmbito científico, técnico e educacional, o trabalho descreve e sistematiza os métodos diagnósticos empregados na rotina laboratorial, evidenciando a importância da atuação do médico-veterinário e das ações de vigilância sanitária. Ademais, a pesquisa possui impacto local, regional e nacional ao fortalecer a rede oficial de diagnóstico da raiva animal, apoiar a vigilância epidemiológica e contribuir para a formação profissional e a produção de conhecimento aplicado ao conceito de Saúde Única.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research, conducted at the Animal Rabies Diagnostic Laboratory of UNESP–FMVA, has a significant impact on society. From a social and public health perspective, the study contributes to addressing a severe and fatal disease, supporting the protection of human and animal health through accurate and timely laboratory diagnosis. In the scientific, technical, and educational spheres, the work describes and systematizes the diagnostic methods applied in routine laboratory practice, highlighting the importance of the veterinarian's role and sanitary surveillance actions. Furthermore, the research has local, regional, and national impact by strengthening the official animal rabies diagnostic network, supporting epidemiological surveillance, and contributing to professional training and the production of knowledge applied to the One Health concept.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

CERTIFICO, para os fins devidos, que **Tayná Giovana Alaniz**, portadora da Cédula de Identidade R.G. 46.977.924-X/SSP-SP, cumpriu todas as atividades do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde da UNESP, denominado Residência Integrada em Medicina Veterinária, desta Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, no período de 01/03/2024 a 28/02/2026, na subárea de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública.

Certifico, também, que a interessada apresentou, em 10/02/2026, o Trabalho de Conclusão de Residência (TCR) intitulado "RAIVA ANIMAL: DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS UNESP FMVA", tendo sido APROVADA diante de Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Márcia Marinho, Prof. Dr. Ricardo Antonio Pilegi Sfaciote, Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes.

Araçatuba, 28 de fevereiro de 2026.



DANIELA BERNADETE ROZZA
Coordenadora do Programa

Ato de Autorização de Funcionamento do Programa: Despacho nº: 210/2013-CCPG/SG

Ato de Reconhecimento do Programa: Parecer nº 1055/2018/CGRS/DEES/SESU/MEC de acordo com a Resolução CNRMS nº 07/2014

LMK/lmk.

Dedico este trabalho à minha mãe, o
grande e eterno amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela estrutura e força durante todo caminho percorrido.

Aos meus pais, Maria Elizabete Tegon Alaniz e Odemir Alaniz, pela benção da vida e amor imensurável, e à minha irmã, Natália Regiane Alaniz, por todo companheirismo e amor.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, por me acolher durante este período de residência, assim como ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde, pela contribuição fundamental para meu desenvolvimento profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia Marinho, por todos os ensinamentos, incentivo e suporte. Sua orientação e garra como Médica Veterinária foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal ao longo da residência.

Aos professores, amigos e colegas de trabalho, Ricardo Sfaciotte, Flávia Lombardi, Gustavo Felippelli, Kátia Bresciani, Cilene, Bárbara, Gabriel, Ma, Beatriz, Giovanna e, em especial à professora Elisa Ponsano e à minha amiga e R2 Larissa Albano, por todos aprendizados compartilhados e apoio constante.

E, por fim, a todos que fizeram parte da minha jornada como residente, meu sincero agradecimento.

“A educação é uma forma de intervenção
no mundo.”

(Paulo Freire).

RESUMO

A raiva é uma zoonose viral grave e fatal que acomete mamíferos e representa um importante problema de saúde pública, tornando o diagnóstico laboratorial fundamental para a vigilância epidemiológica e a adoção de medidas de controle. Este trabalho teve como objetivo abordar os principais diagnósticos laboratoriais empregados para a raiva animal no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA. O diagnóstico baseia-se principalmente na imunofluorescência direta, método padrão para a detecção do antígeno viral em tecidos do sistema nervoso central, devido à sua rapidez, sensibilidade e confiabilidade. A prova biológica em camundongos, tradicionalmente utilizada como método complementar, foi substituída pelo encaminhamento das amostras para confirmação por reação em cadeia da polimerase em laboratório de referência, contribuindo para a redução do uso de animais e para a adoção de práticas mais éticas e modernas. A análise dos métodos diagnósticos evidencia a importância da padronização dos procedimentos, da biossegurança e da capacitação técnica da equipe, reforçando o papel do laboratório na rede oficial de diagnóstico da raiva animal e na proteção da saúde humana e animal.

Palavras-chave: raiva animal; diagnóstico laboratorial; imunofluorescência direta; vigilância epidemiológica; saúde única.

ABSTRACT

Rabies is a severe and fatal viral zoonosis that affects mammals and represents a significant public health problem, making laboratory diagnosis essential for epidemiological surveillance and the implementation of control measures. This study aimed to address the main laboratory diagnostic methods employed for animal rabies at the Animal Rabies Diagnostic Laboratory of UNESP–FMVA. Diagnosis is primarily based on the direct fluorescent antibody test, the gold standard method for detecting viral antigen in central nervous system tissues, due to its rapidity, sensitivity, and reliability. The biological assay in mice, traditionally used as a complementary method, was replaced by the referral of samples for confirmation by polymerase chain reaction in a reference laboratory, contributing to the reduction in the use of animals and to the adoption of more ethical and modern practices. The analysis of the diagnostic methods highlights the importance of procedure standardization, biosafety, and technical training of the staff, reinforcing the role of the laboratory within the official animal rabies diagnostic network and in the protection of human and animal health.

Keywords: animal rabies; laboratory diagnosis; direct fluorescent antibody test; epidemiological surveillance; one health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recebimento, registro e triagem das amostras	20
Figura 2 – Processamento de quiróptero	21
Figura 3 – Processamento de encéfalo de cão	21
Figura 4 – Técnica de IFD	23
Figura 5 – Amostra positiva na IFD	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCN	Cérebro de Camundongo Normal
CVS	Challenge Virus Standard
IFD	Imunofluorescência Direta
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E DO LABORATÓRIO	19
3.2	RECEBIMENTO, REGISTRO E TRIAGEM DAS AMOSTRAS	19
3.3	BIOSSEGURANÇA E PREPARO DO AMBIENTE	20
3.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	20
3.5	TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	32
	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	32

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose viral grave e fatal que afeta mamíferos, sendo transmitida principalmente pela saliva de animais infectados, por meio de mordeduras, arranhaduras ou contato com mucosas. Trata-se de uma doença de grande importância para a saúde pública, pois, após o início dos sinais clínicos, a evolução é praticamente sempre fatal, tanto em animais quanto em seres humanos. No Brasil, apesar dos avanços no controle da raiva urbana, a doença ainda ocorre e exige vigilância constante (Brasil, 2025).

A transmissão da raiva ocorre por diferentes ciclos epidemiológicos. O ciclo urbano envolve principalmente cães e gatos, enquanto o ciclo silvestre inclui animais como morcegos, raposas e outros mamíferos silvestres. Destaca-se também o ciclo rural, no qual os morcegos hematófagos exercem papel importante na transmissão do vírus para herbívoros domésticos. A coexistência desses ciclos favorece a manutenção do vírus no ambiente e aumenta o risco de transmissão para animais domésticos e para o ser humano, reforçando a necessidade de vigilância e diagnóstico laboratorial contínuos (Brasil, 2009, 2025).

Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial da raiva animal é fundamental para a vigilância epidemiológica e para a adoção de medidas de prevenção e controle. A confirmação dos casos suspeitos permite orientar ações sanitárias, apoiar decisões relacionadas à profilaxia da raiva humana e contribuir para o monitoramento dos ciclos de transmissão da doença. O diagnóstico é realizado, principalmente, a partir da análise de amostras do sistema nervoso central, uma vez que o vírus apresenta afinidade por esse tecido (Brasil, 2008).

O Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA, o qual está sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Marinho, integra a rede oficial de diagnóstico e recebe amostras provenientes de aproximadamente 40 municípios da região noroeste de São Paulo. As amostras analisadas são constituídas principalmente por morcegos, além de tecidos do sistema nervoso central de cães, gatos, bovinos, equinos e outros mamíferos, refletindo a diversidade de espécies envolvidas nos diferentes ciclos da raiva e a ampla área de abrangência do serviço prestado pelo laboratório. Durante o período de residência, nos anos de 2024 e 2025, foram registradas 213 e 323 amostras, respectivamente, sendo a maioria proveniente de quirópteros.

A técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) é utilizada rotineiramente no laboratório e é recomendada como método padrão para o diagnóstico da raiva animal, por apresentar rapidez, boa confiabilidade e ampla aplicação na rede oficial de laboratórios (Brasil, 2008; Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2018). Anteriormente, além da IFD, o laboratório realizava o isolamento viral por meio da inoculação intracerebral em camundongos como método complementar. Atualmente, esse procedimento foi substituído pelo encaminhamento das amostras para confirmação por técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR), realizada no Instituto Pasteur laboratório de referência localizado em São Paulo.

Diante desse cenário, este trabalho tem como objetivo descrever a rotina e os métodos empregados no diagnóstico da raiva animal no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA. A relevância do estudo está na organização e no registro das atividades desenvolvidas no laboratório, bem como na discussão da transição dos métodos diagnósticos, contribuindo para o fortalecimento da vigilância da raiva animal. Como limitação, destaca-se a dependência de capacitação externa para a implementação da RT-PCR, o que reforça a importância da integração entre os laboratórios da rede oficial de diagnóstico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A raiva é uma zoonose viral causada por vírus do gênero *Lyssavirus*, pertencente à família *Rhabdoviridae*, caracterizada por encefalite aguda e evolução fatal após o aparecimento dos sinais clínicos. O vírus apresenta marcado tropismo pelo sistema nervoso central, sendo capaz de infectar uma ampla variedade de mamíferos domésticos e silvestres, o que contribui para sua manutenção em diferentes ecossistemas e ciclos epidemiológicos (Fooks *et al.*, 2017; Scott; Nel, 2021).

Atualmente, a raiva continua sendo considerada uma doença de grande relevância sanitária, mesmo em países que obtiveram avanços no controle do ciclo urbano. Dados recentes do Ministério da Saúde indicam que, entre 2010 e 2025, foram registrados cerca de 50 casos de raiva humana no Brasil, com a maioria associada à transmissão por morcegos e outras espécies silvestres. Esses casos ocorreram apesar da eliminação da raiva urbana transmitida por cães há mais de dez anos, evidenciando que a circulação do vírus persiste no país, especialmente no ciclo silvestre (Brasil, 2025). Esse cenário reforça a importância da vigilância contínua, do diagnóstico laboratorial eficiente e da integração entre a medicina veterinária e a saúde pública.

O vírus da raiva apresenta diferentes variantes antigênicas, geralmente associadas a reservatórios específicos. No Brasil, essas variantes circulam entre cães, morcegos hematófagos e não hematófagos, além de outros mamíferos silvestres, sendo fundamentais para a compreensão da epidemiologia da doença e para o direcionamento das ações de controle e vigilância (Brasil, 2009; Fisher; Streicker; Schnell, 2018).

A manutenção da raiva na natureza ocorre por meio de diferentes ciclos epidemiológicos. O ciclo urbano envolve principalmente cães e gatos, enquanto o ciclo rural está relacionado, sobretudo, à transmissão por morcegos hematófagos a herbívoros domésticos, como bovinos e equinos, causando impactos sanitários e econômicos relevantes. O ciclo silvestre inclui morcegos e outros mamíferos silvestres, que atualmente representam importante fonte de infecção para humanos e animais domésticos, especialmente em áreas urbanas e periurbanas (Begeman *et al.*, 2018; Brasil, 2009, 2025).

A transmissão do vírus da raiva ocorre, principalmente, por meio da saliva de animais infectados, através de mordeduras, arranhaduras ou contato da saliva com mucosas e feridas. Após a inoculação, o vírus replica-se localmente e migra por meio dos nervos periféricos até o sistema nervoso central, onde provoca inflamação intensa e alterações neurológicas graves (Jackson, 2018; Scott; Nel, 2021).

O período de incubação da raiva nos animais é variável, podendo durar semanas ou meses, dependendo de fatores como a espécie acometida, a quantidade de vírus inoculada e a localização da lesão. O período de transmissibilidade geralmente inicia-se pouco antes do aparecimento dos sinais clínicos e se estende até a morte do animal, o que reforça a importância do diagnóstico laboratorial rápido e preciso (Brasil, 2008, 2025).

Clinicamente, a raiva pode manifestar-se sob duas formas principais: a forma furiosa e a forma paralítica. A raiva furiosa caracteriza-se por alterações comportamentais, agressividade, inquietação, hipersensibilidade e salivação excessiva. Já a forma paralítica apresenta evolução mais discreta, com paresias progressivas e paralisia flácida, podendo dificultar o diagnóstico clínico e atrasar a suspeita da doença (Fooks *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017).

A profilaxia da raiva baseia-se, principalmente, na vacinação dos animais, no controle dos reservatórios e na profilaxia pré e pós-exposição em humanos. Nesse contexto, o médico veterinário desempenha papel fundamental na prevenção, no diagnóstico e no controle da doença, atuando de forma integrada com os serviços de saúde humana, conforme o conceito de saúde única (Brasil, 2016, 2025).

O diagnóstico laboratorial da raiva animal é indispensável para a vigilância epidemiológica, confirmação dos casos suspeitos e orientação das medidas de controle. Os métodos diagnósticos são realizados, principalmente, em amostras post mortem do sistema nervoso central. A técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) é considerada o método padrão, sendo amplamente utilizada por apresentar rapidez, sensibilidade e especificidade adequadas para a rotina laboratorial (Brasil, 2008; Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2018).

A prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos é um método tradicionalmente utilizado como complemento ao diagnóstico da raiva, possibilitando o isolamento viral. Apesar de ainda ser aplicada em determinados contextos, apresenta limitações relacionadas ao tempo de resposta, aos custos e às questões éticas associadas ao uso de animais de laboratório, o que tem motivado a

adoção progressiva de métodos moleculares (Brasil, 2008; Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2019).

Atualmente, métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR), têm sido cada vez mais utilizados no diagnóstico da raiva, permitindo a detecção do material genético viral com alta sensibilidade e contribuindo para a redução do uso de animais de laboratório. Além disso, a RT-PCR possibilita estudos de caracterização genética do vírus, fortalecendo as ações de vigilância epidemiológica (Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2019; Singh *et al.*, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E DO LABORATÓRIO

O presente trabalho teve caráter descritivo e foi desenvolvido no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, câmpus de Araçatuba (UNESP – FMVA), sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Marinho. O laboratório integra a rede oficial de diagnóstico da raiva animal e atua no apoio às ações de vigilância epidemiológica.

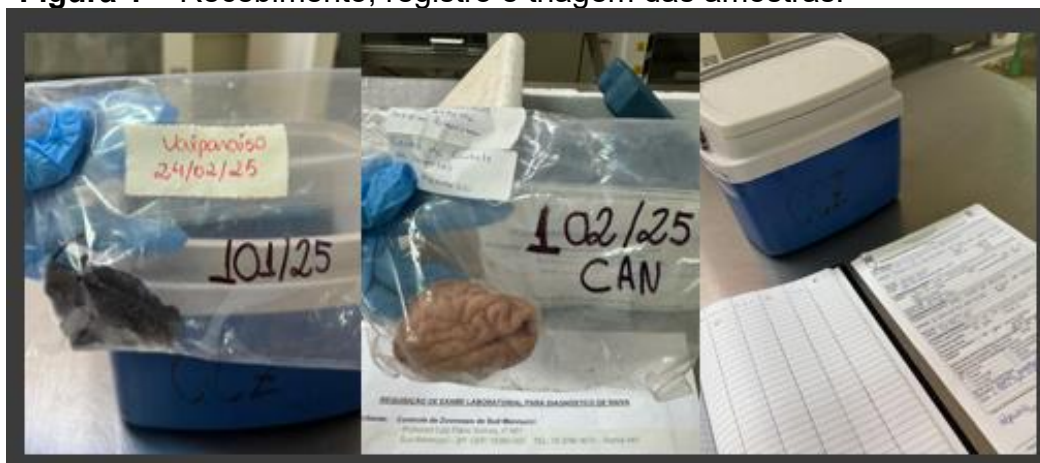
O Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA recebe amostras provenientes de aproximadamente 40 municípios noroeste de São Paulo, sendo compostas principalmente por morcegos e por amostras de sistema nervoso central de cães, gatos, bovinos, equinos e outros mamíferos, encaminhadas por serviços de vigilância sanitária e unidades de saúde animal.

3.2 RECEBIMENTO, REGISTRO E TRIAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras foram recebidas em caixas térmicas adequadas, acompanhadas da requisição laboratorial devidamente preenchida (Fig. 1). O entregador aguardou a conferência completa da documentação antes da liberação. Após a verificação das informações, as amostras foram retiradas da caixa térmica e armazenadas em freezer até o momento do processamento.

Uma via da requisição foi assinada pelo médico-veterinário responsável e devolvida ao entregador, enquanto a via retida teve seus dados transcritos para o livro de controle de recebimento de amostras do laboratório. Nos casos de amostras provenientes de animais agressores ou associadas a acidentes envolvendo seres humanos, estas foram identificadas como prioritárias, conforme as normas de vigilância da raiva.

Figura 1 – Recebimento, registro e triagem das amostras.



Fonte: Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal UNESP – FMVA Profa. Márcia Marinho.

3.3 BIOSSEGURANÇA E PREPARO DO AMBIENTE

Antes do início de qualquer procedimento laboratorial, foi obrigatório o uso de equipamentos de proteção individual, incluindo gorro, máscara, jaleco descartável de manga longa, óculos de proteção e luvas. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar previamente higienizada com álcool a 70%.

As atividades seguiram as recomendações do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva e os protocolos aprendidos durante o treinamento realizado no Instituto Pasteur, em São Paulo, para uma turma anterior de residentes, os quais seguem com os aprendizados adiante, garantindo condições adequadas de biossegurança para os profissionais e para o ambiente laboratorial.

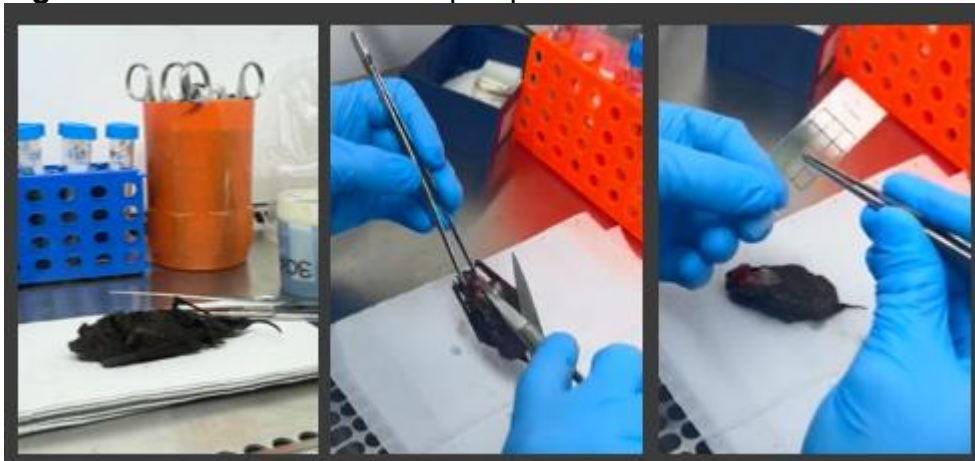
3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente antes do processamento. Simultaneamente, a capela de fluxo laminar foi preparada com os materiais necessários, incluindo pinças, tesouras, placas de Petri, tubos estéreis tipo Falcon, microtubos estéreis tipo Eppendorf, lâminas para imunofluorescência direta, papel microfiltro, coplin, recipientes para descarte e materiais para identificação.

Para amostras provenientes de animais inteiros, como quirópteros, a pele da região encefálica foi rebatida por meio de uma perfuração na região occipital, seguida de corte em sentido cranial com o auxílio de tesoura. Uma pequena

quantidade do encéfalo foi coletada com pinça estéril e utilizada para a confecção do *imprint* nas lâminas destinadas à imunofluorescência direta (Fig. 2).

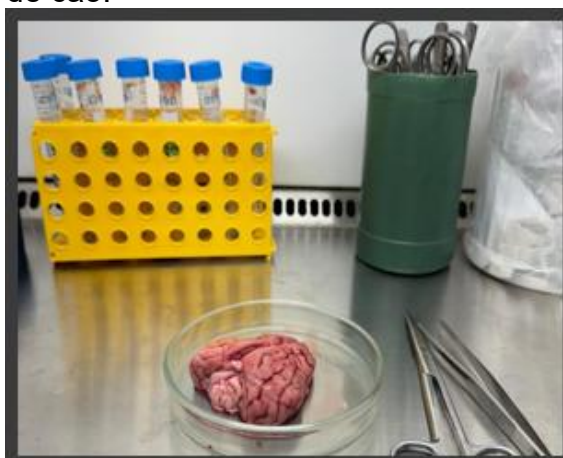
Figura 2 – Processamento de quiróptero.



Fonte: Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal UNESP – FMVA Profa. Márcia Marinho.

Quando as amostras consistiam apenas em encéfalo (Fig. 3), o cérebro foi separado do cerebelo, os córtices foram individualizados e o hipocampo foi identificado, por ser uma região com maior concentração viral. Uma pequena porção do hipocampo foi retirada para a realização do *imprint* nas lâminas. O excesso de material é removido com papel microfiltro, aplicando-se leve pressão para preservar o material aderido.

Figura 3 – Processamento de encéfalo de cão.



Fonte: Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal UNESP – FMVA Profa. Márcia Marinho.

Após a confecção do *imprint*, parte do material encefálico foi acondicionada em microtubos estéreis tipo Eppendorf e encaminhada ao Instituto Pasteur, em São Paulo, laboratório de referência nacional, para confirmação diagnóstica por métodos complementares, incluindo técnicas moleculares. Outra parte do material foi acondicionada em tubos estéreis tipo Falcon e armazenada em freezer a -20°C no próprio laboratório.

As lâminas confeccionadas foram colocadas em coplin contendo acetona (99,8%) por 45 minutos para fixação do material. Após esse período, as lâminas foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C até a realização da técnica de imunofluorescência direta.

Ao final do processamento, os materiais reutilizáveis foram lavados com água e sabão e higienizados com solução de hipoclorito de sódio. A capela de fluxo laminar foi novamente desinfetada com álcool a 70%.

3.5 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A técnica de imunofluorescência direta (Fig. 4) é realizada de acordo com as recomendações do Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva e os protocolos adotados pelos laboratórios de referência. São utilizadas as soluções de cérebro de camundongo normal (CCN) e solução Challenge Virus Standard (CVS), a solução tampão fosfato salina e o conjugado antirrábico constituído por imunoglobulinas específicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína.

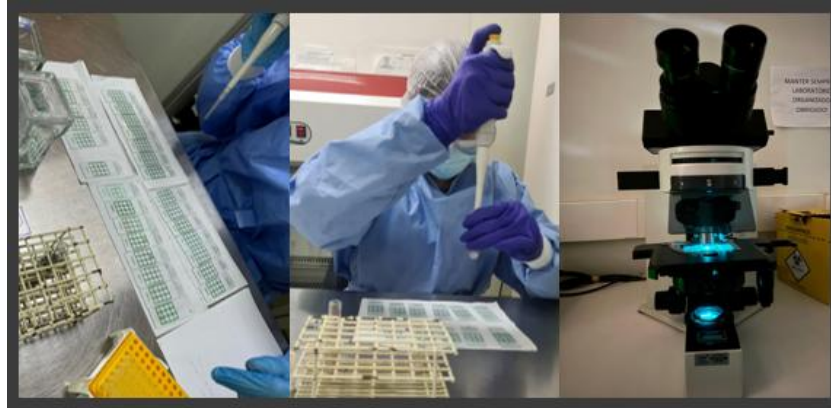
O CCN é utilizado como controle negativo, por não conter antígeno viral, enquanto o CVS é empregado como controle positivo, por conter o vírus da raiva. Em todas as reações são incluídas lâminas sabidamente positivas e uma lâmina sabidamente negativa, com a finalidade de garantir a confiabilidade dos resultados e evitar interpretações falso-positivas ou falso-negativas.

Inicialmente, são preparadas duas diluições em tubos de ensaio: a diluição A, composta por CVS e conjugado antirrábico, e a diluição B, composta por CCN e conjugado antirrábico. As diluições são mantidas sob refrigeração e protegidas da luz por aproximadamente 10 minutos, a fim de preservar a estabilidade do conjugado fluorescente e evitar a degradação da fluoresceína.

Após esse período, são pipetados 25 μL da diluição A na porção superior das lâminas e 25 μL da diluição B na porção inferior, incluindo as lâminas controle

positivo e negativo. As lâminas são mantidas em recipiente plástico contendo ambiente úmido, favorecendo a reação antígeno-anticorpo, e posteriormente incubadas em estufa por 30 minutos.

Figura 4 – Técnica de IFD.

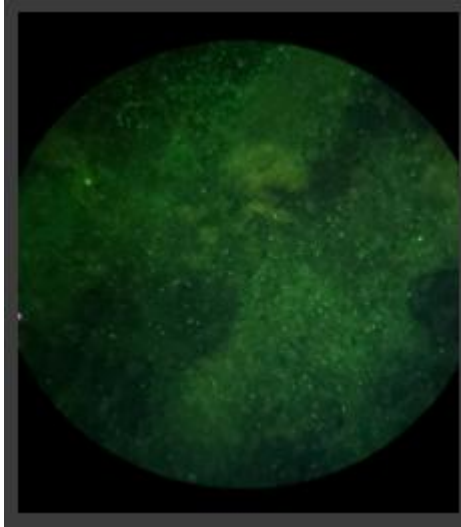


Fonte: Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal UNESP – FMVA
Profa. Márcia Marinho.

Concluída a etapa de incubação, as lâminas são submetidas a duas lavagens com solução tampão fosfato salina, com duração de 10 minutos cada, seguidas de três lavagens com água destilada, com duração de cinco minutos cada, com o objetivo de remover o conjugado não ligado ao antígeno. Após as lavagens, as lâminas são colocadas em suporte adequado e levadas novamente à estufa por 30 minutos para secagem final.

A técnica de imunofluorescência direta baseia-se na ligação específica entre os anticorpos antirrábicos marcados com fluoresceína e o antígeno viral presente no tecido encefálico fixado na lâmina. Nas amostras positivas, essa ligação resulta na visualização de estruturas fluorescentes de coloração verde-maçã, com brilho intenso, características da presença do vírus da raiva, enquanto nas amostras negativas ocorre a ausência de fluorescência após as etapas de lavagem.

Figura 5 – Amostra positiva na IFD.



Fonte: Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal UNESP – FMVA Profa. Márcia Marinho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A raiva é uma zoonose viral de elevada letalidade, caracterizada por encefalite progressiva aguda, causada por vírus pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus* (Fooks *et al.*, 2017). No Brasil, o agente circulante é o *Rabies virus* (RABV), responsável pela raiva clássica, pertencente ao genótipo 1, com diferentes variantes antigênicas associadas a reservatórios específicos, o que confere à doença um perfil epidemiológico dinâmico e regionalizado (Scott; Nel, 2021).

A manutenção do vírus da raiva na natureza ocorre por meio de diferentes ciclos epidemiológicos, incluindo os ciclos urbano, rural, silvestre e aéreo. Atualmente, observa-se maior relevância dos ciclos silvestre e aéreo, nos quais os animais silvestres desempenham papel fundamental como reservatórios naturais do vírus. Destacam-se os morcegos, tanto hematófagos quanto não hematófagos, que atuam como importantes fontes de infecção para animais domésticos, de produção e seres humanos. Além dos quirópteros, outros mamíferos silvestres, como primatas não humanos, raposas e carnívoros silvestres, participam da manutenção e disseminação do vírus em determinadas regiões, contribuindo para a complexidade do perfil epidemiológico da doença no Brasil (Begeman *et al.*, 2018; Scott; Nel, 2021).

Apesar dos avanços significativos no controle da raiva urbana transmitida por cães, a persistência do vírus nos ciclos silvestre e aéreo mantém a raiva como um relevante problema de saúde pública no país. Dados recentes do Ministério da Saúde indicam que, entre 2010 e 2025, foram registrados aproximadamente 50 casos de raiva humana no Brasil, sendo a maioria associada à transmissão por morcegos e outros animais silvestres. Esses dados evidenciam que, embora a raiva urbana tenha sido controlada em grande parte do território nacional, a circulação do vírus em reservatórios silvestres representa um risco constante, reforçando a necessidade de vigilância epidemiológica contínua, diagnóstico laboratorial eficiente e ações integradas entre a saúde pública, a medicina veterinária e os órgãos ambientais (Brasil, 2025).

Nesse cenário, o diagnóstico laboratorial da raiva animal exerce papel fundamental, não apenas na confirmação dos casos suspeitos, mas também como importante instrumento da vigilância epidemiológica. Por meio dele, é possível identificar áreas de risco, reconhecer as variantes virais em circulação e orientar de

forma adequada as ações de controle e prevenção da doença. A detecção oportuna e confiável da infecção em animais é decisiva para a proteção da saúde humana e animal, pois subsidia a adoção imediata das medidas de profilaxia pós-exposição e das ações de bloqueio de foco, contribuindo para a redução do risco de novos casos.

Dentre os métodos diagnósticos disponíveis, a imunofluorescência direta (IFD) é considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico da raiva animal, sendo amplamente recomendada por organismos internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) (Fooks *et al.*, 2017; Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2018). A técnica baseia-se na detecção direta do antígeno viral presente no tecido do sistema nervoso central, por meio da ligação específica entre anticorpos antirrâbicos marcados com fluoresceína e o antígeno viral. Nas amostras positivas, observa-se fluorescência verde-maçã intensa, característica e facilmente reconhecível, o que confere elevada sensibilidade e especificidade ao método.

Além da confiabilidade, a IFD apresenta como principais vantagens a rapidez na obtenção dos resultados, o custo relativamente baixo e a possibilidade de aplicação em laboratórios de rotina, desde que haja infraestrutura adequada, biossegurança e equipe treinada. Essas características tornam a técnica especialmente relevante para a vigilância da raiva em regiões endêmicas, permitindo respostas rápidas às suspeitas de infecção e contribuindo para a redução do risco de transmissão ao ser humano.

A prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos foi amplamente utilizada como método complementar ao diagnóstico, principalmente em situações em que a carga viral do material era baixa ou quando os resultados da IFD eram inconclusivos. Esse método possibilita o isolamento e a amplificação do vírus, permitindo posterior confirmação diagnóstica e caracterização viral (Brasil, 2008). No entanto, a técnica apresenta limitações importantes, como o tempo prolongado para obtenção dos resultados, que pode variar de 21 a 30 dias, os custos operacionais elevados e, sobretudo, as questões éticas relacionadas ao uso de animais de laboratório.

Embora ainda seja empregada em alguns contextos, a prova biológica vem sendo progressivamente substituída por métodos alternativos que atendem aos princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição do uso de animais), alinhando-se às diretrizes atuais de bem-estar animal e ética em pesquisa (Rupprecht;

Fooks; Abela-Ridder, 2019). Nesse sentido, os métodos moleculares têm ganhado destaque no diagnóstico da raiva.

A Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR) destaca-se como uma ferramenta diagnóstica de alta sensibilidade, capaz de detectar o material genético viral mesmo em amostras com baixa carga viral ou em estágios iniciais da infecção. Além de contribuir para a redução do uso de animais de laboratório, a RT-PCR permite a caracterização genética do vírus, possibilitando estudos filogenéticos, identificação de variantes circulantes e melhor compreensão das cadeias de transmissão (Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder, 2019; Singh *et al.*, 2017).

Na prática diagnóstica, a utilização integrada dessas metodologias fortalece a confiabilidade dos resultados. A IFD permanece como método de escolha para triagem e diagnóstico inicial, enquanto a RT-PCR atua como ferramenta confirmatória e complementar, especialmente em laboratórios de referência. A prova biológica, por sua vez, mantém importância histórica e técnica, sendo atualmente restrita a situações específicas, quando outros métodos não estão disponíveis ou quando há necessidade de isolamento viral.

O presente trabalho, ao descrever a rotina diagnóstica da raiva animal no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA, evidencia a importância da padronização dos procedimentos laboratoriais, da biossegurança e da capacitação técnica da equipe. O laboratório recebe amostras principalmente de morcegos e de sistema nervoso central de cães, gatos e bovinos provenientes de aproximadamente 40 municípios da região noroeste de São Paulo, desempenhando papel fundamental na rede oficial de vigilância da raiva animal.

A atuação desse laboratório contribui diretamente para a saúde pública, uma vez que os resultados diagnósticos subsidiam decisões sobre profilaxia pós-exposição em humanos, ações de bloqueio de foco, campanhas de vacinação animal e estratégias de educação em saúde. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial da raiva animal configura-se como um elo essencial entre a medicina veterinária e a saúde pública, reforçando o conceito de Uma Só Saúde.

Assim, a descrição detalhada das técnicas empregadas e da rotina laboratorial apresentada neste trabalho destaca não apenas a relevância técnica dos métodos diagnósticos, mas também a importância estratégica do diagnóstico da raiva

animal como ferramenta indispensável para a vigilância epidemiológica, o controle da doença e a proteção da saúde humana e animal.

5 CONCLUSÃO

A abordagem dos diagnósticos laboratoriais da raiva animal realizados no Laboratório de Diagnóstico de Raiva Animal da UNESP – FMVA evidenciou a importância do diagnóstico como componente central da vigilância epidemiológica e da proteção da saúde pública, humana e animal. A Imunofluorescência Direta consolidou-se como o principal método empregado na rotina diagnóstica, em razão de sua rapidez, sensibilidade e confiabilidade para a detecção do antígeno viral, enquanto a prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos, tradicionalmente utilizada como técnica complementar, apresenta limitações que têm favorecido sua substituição por métodos moleculares, como a RT-PCR, atualmente realizada em laboratórios de referência e em vias de implementação no próprio laboratório da UNESP – FMVA. A atuação do laboratório, responsável pela análise de amostras provenientes de aproximadamente 40 municípios da região noroeste de São Paulo, contribui de forma decisiva para a identificação de áreas de risco, o direcionamento das ações de controle e o suporte à tomada de decisões pelas autoridades sanitárias, reforçando o papel estratégico da medicina veterinária e do diagnóstico laboratorial no contexto da Saúde Única e no enfrentamento de uma zoonose grave e fatal ainda presente no Brasil.

REFERÊNCIAS

BEGEMAN, L.; GEURTSVANKESSEL, C.; FINKE, S.; FREULING, C. M.; KOOPMANS, M.; MÜLLER, T.; RUIGROK, T. J. H.; KUIKEN, T. Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 18, n. 4, p. e147-e159, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30574-1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros**: manual técnico. 2. ed. Brasília, DF: MAPA, 2009. 124 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/programas-de-saude-animal/raiva-dos-herbivoros-eeeb/copy2_of_MANUAL_RAIVAHARBVOROS2009.pdf. Acesso em: 1 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva>. Acesso em: 1 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses**: normas técnicas e operacionais. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016. 121 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf. Acesso em: 1 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008. 108 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/raiva/manual-de-diagnostico-laboratorial-da-raiva.pdf/view>. Acesso em: 1 dez. 2025.

FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 16, n. 4, p. 241-255, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.11.

FOOKS, A. R.; CLIQUET, F.; FINKE, S.; FREULING, C.; HEMACHUDHA, T.; MANI, R. S.; MÜLLER, T.; NADIN-DAVIS, S.; PICARD-MEYER, E.; WILDE, H.; BANYARD, A. C. Rabies. **Nature Reviews. Disease Primers**, London, v. 3, art. 17091, p. 1-20, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.91.

JACKSON, A. C. Rabies: a medical perspective. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 37, n. 2, p. 569-580, 2018. DOI: 10.20506/rst.37.2.2825.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2018. v. 1. 289 p. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/310836>. Acesso em: 20 nov. 2025.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2019. v. 2. 202 p. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/310837>. Acesso em: 20 nov. 2025.

SCOTT, T. P.; NEL, L. H. Lyssaviruses and the fatal encephalitic disease rabies. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, art. 786953, p. 1-7, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.786953.

SINGH, R.; SINGH, K. P.; CHERIAN, S.; SAMINATHAN, M.; KAPOOR, S.; REDDY, G. B. M.; PANDA, S.; DHAMA, K. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 37, n. 1, p. 212-251, 2017. DOI: 10.1080/01652176.2017.1343516.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Nota técnica nº 8/2022-CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Informa sobre atualizações no Protocolo de Profilaxia pré, pós e reexposição da raiva humana no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 10 mar. 2022. 7 p. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-deconteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2022/copy_of_nota-tecnica-n-8_2022-cgzv_deidt_svs_ms.pdf/view. Acesso em: 1 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de vigilância em saúde**. 6. ed. rev. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. 3 v. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_6edrev_v3.pdf. Acesso em: 1 dez. 2025.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2014. 2 v. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2649-8/>. Acesso em: 1 dez. 2025.