

VITÓRIA BUENO VILELA SILVEIRA

**Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*  
para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras de  
animais no Brasil**

**São Paulo**

**2022**

VITÓRIA BUENO VILELA SILVEIRA

**Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras de animais no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:** Patologia

**Área de Concentração:**  
Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:** Prof. Dr. Enio Mori

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4198  
FMVZ

Silveira, Vitória Bueno Vilela

Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras de animais no Brasil / Vitória Bueno Vilela Silveira. – 2022.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Enio Mori.

1. Raiva. 2. Imunofluorescência direta. 3. RT-qPCR. 4. LN34 Pan-*Lyssavirus*. 5. Singleplex. I. Título.

# CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

São Paulo, 24<sup>th</sup> April 2022

### CERTIFIED

We certify that the Research "Performance and cost analysis of the LN34 Pan-Lyssavirus RT-qPCR assay for the detection of rabies virus in CNS samples from the Instituto Pasteur de São Paulo", protocol number CEUAX 7229310320 (ID 001514), under the responsibility Enio Mori, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day July 10, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Análise do desempenho e custo do ensaio LN34 Pan-Lyssavirus de RT-qPCR para detecção do vírus da raiva em amostras de SNC provenientes do Instituto Pasteur de São Paulo", protocolado sob o CEUAX nº 7229310320, sob a responsabilidade de Enio Mori, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 10 de julho de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 12 de maio de 2022

CEUAX N 7229310320

(ID 001592)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Enio Mori

Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil".

### CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 24/abril/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 24/abril/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O diagnóstico laboratorial primário da raiva se baseia na detecção de antígeno viral em amostras de tecido nervoso pela prova de imunofluorescência direta (IFD). Como a raiva é uma doença que apresenta letalidade próxima a 100%, os testes diagnósticos devem apresentar alta sensibilidade e especificidade. Portanto, com o intuito de aumentar a acurácia dos resultados, deve-se associar outras provas diagnósticas como testes confirmatórios a IFD. Os testes complementares tradicionalmente preconizados são o isolamento viral em camundongos e cultivo de células. No entanto, devido a intercorrências apresentadas por estes testes como diminuição da sensibilidade em amostras com baixa carga viral ou em avançado estado de autólise. Como as decisões máximas na profilaxia pós-exposição a um agravo e a adoção de medidas de controle de um foco positivo é dependente do resultado laboratorial, é necessária a implementação de técnicas confirmatórias à IFD que sejam sensíveis, específicas, rápidas e acuradas, para que os resultados sejam sempre fidedignos. Uma alternativa para esses testes tradicionais são as técnicas moleculares de RT-PCR e RT-qPCR. O ensaio LN34 Pan-Lyssavirus de RT-qPCR desenvolvido pelo CDC de Atlanta/EUA apresentou resultados promissores e tem sido considerado um forte candidato para o diagnóstico da raiva por conta da alta sensibilidade e especificidade, rapidez, robustez e caráter universal para a detecção de diferentes variantes ou linhagens genéticas do RABV. O objetivo do presente estudo será avaliar o desempenho do ensaio LN34 em 300 amostras clínicas provenientes do sistema de vigilância da raiva animal do Instituto Pasteur de São Paulo. Adicionalmente, analisa-se também o custo de diferentes marcas de reagentes comerciais e equipamentos (plataformas) de PCR em tempo real em relação ao ensaio LN34 Pan-Lyssavirus de RT-qPCR."

Comentário da CEUA: Título do projeto alterado atendendo solicitação do responsável

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVEIRA, Vitória Bueno Vilela

Título: Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras de animais no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais que, como sempre, são o meu alicerce.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família que me incentivou e me apoiou a todo momento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Enio Mori que me deu a oportunidade e pacientemente me ajudou por toda essa jornada.

À Maria Eduarda Rodrigues Chierato que me auxiliou nas mais diversas dificuldades.

À Carolina Alencar de Melo pelo grande auxílio na identificação morfológica das espécies dos quirópteros.

Aos funcionários do Instituto Pasteur de São Paulo que me acolheram e auxiliaram durante todo esse processo.

À Luciana Hardt, ex-diretora do Instituto Pasteur, à Andrea de Cassia Rodrigues, atual diretora, e à Luciana Botelho Chaves, chefe dos laboratórios, pela recepção e atenção que me foram dadas.

Ao Instituto Pasteur pela infraestrutura e colaboração oferecida que foram de suma importância para a concretização desse projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprender e por toda contribuição para realizar esse trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio de Pesquisa (19/02637-2) concedido.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que apoiou essa pesquisa através do Código de Financiamento 001.



*“São nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos” (ROWLING, 2000).*

## RESUMO

SILVEIRA, V. B. V., Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Uma das doenças mais antigas e avassaladoras que ainda se tem atualmente é a raiva. Essa doença é causada por um vírus (RABV) do gênero *Lyssavirus* que acomete o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Portanto, é uma infecção que causa manifestações neurológicas e que, quando esses sintomas se apresentam, quase 100% dos casos chegam ao óbito. Por conseguinte, essa doença requer que seu diagnóstico seja ágil e o mais confiável possível. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica a técnica de imunofluorescência direta (IFD) como o teste padrão ouro para o diagnóstico da raiva post-mortem. Essa técnica é rápida e possui resultados acurados, visto que ela possui alta sensibilidade e especificidade. Contudo, alguns fatores podem reduzir sua sensibilidade tais como: amostra degradada, baixa qualidade do anticorpo e do microscópio utilizados, e a experiência do laboratorista. Diante disso, é recomendado que se faça um teste confirmatório. Por muitos anos, testes como isolamento viral (em camundongo e em cultivo celular) e RT-PCR foram utilizados como testes confirmatórios à IFD. Recentemente, a OMS apresentou uma nova técnica de RT-qPCR para o confirmar o diagnóstico da raiva, o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* em um teste *singleplex*. Nos estudos realizados, o LN34 tem apresentado alta sensibilidade e especificidade diagnósticas, porém há poucas investigações em amostras brasileiras que, por natureza, possuem sequências genéticas distintas do RABV. Além disso, técnicas moleculares tendem a ser mais dispendiosas, o que restringiria o acesso a esse tipo de diagnóstico. Uma opção para reduzir os custos do LN34 é utilizar RT-qPCR no formato *multiplex* ao invés do *singleplex*. Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de comparar o desempenho da IFD e da LN34 nos modos *singleplex* e *multiplex*. No primeiro experimento, o ensaio LN34 *singleplex* foi testado utilizando 332 amostras de animais (170 IFD positivas) oriundas do estado de São Paulo. O ensaio LN34 *singleplex* demonstrou alta sensibilidade (100%) e especificidade (96,7%) diagnósticas em comparação com o teste de IFD, e todas as amostras IFD positivas tiveram resultados concordantes com o do ensaio LN34 *singleplex*. No segundo experimento, LN34 *multiplex* foi feito em paralelo com LN34 *singleplex* usando 211 amostras de animais

de SNC (102 IFD positivos) procedentes de diferentes municípios do estado de São Paulo. O ensaio LN34 *multiplex* apresentou alta sensibilidade (93,4%) e alta especificidade (100%), enquanto o ensaio LN34 *singleplex* apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100% e 95,3%, respectivamente. Conclui-se que o LN34 *singleplex* possui grande potencial para ser usado como teste confirmatório para diagnosticar raiva e, embora tenha resultados semelhantes, o LN34 *multiplex* ainda possui sensibilidade diagnóstico menor que o *singleplex*.

**Palavras-chave:** raiva, imunofluorescência direta, RT-qPCR, LN34 Pan-Lyssavirus, *singleplex*.

## ABSTRACT

SILVEIRA, V. B. V., Performance analysis of the RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* assay for rabies laboratory surveillance and diagnosis of animal samples from Brazil. Master thesis (Master of Science) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

One of the oldest and devastating disease that are still present nowadays is rabies. This disease is caused by a virus (RABV) from the *Lyssavirus* genus that affect the central nervous system (CNS) of mammals. Therefore, it is an infection giving neurological manifestations and, once they start showing, almost 100% of the infected will likely die. For this reason, this disease requires a rapid and reliable diagnosis. The World Health Organization (WHO) indicates the direct fluorescent antibody test (dFAT) as the gold standard test for post-mortem rabies diagnosis. This technique is fast and has accurate results, since it has high diagnostic sensitivity and specificity. On the other hand, some factors may reduce its sensitivity such as: degraded samples, low quality of antibody and microscope used, and the technician experience. Hence the need for a confirmatory test. For many years, tests such as mouse inoculation test (MIT), rabies tissue culture infection test (RTCIT) and RT-PCR were used as dFAT confirmatory tests. Recently, the WHO introduced a new RT-qPCR technique for rabies diagnosis, the LN34 Pan-*Lyssavirus* assay in a singleplex test. In the studies, the LN34 has shown high diagnostic sensitivity and specificity, but there are only a few investigations in Brazilian samples, which naturally have peculiar genetic sequences of RABV. In addition, molecular techniques are usually more expensive, which might limit the access to rabies diagnosis. A possible solution for this situation could be to perform a RT-qPCR multiplex instead of the singleplex in the LN34 assay. Thus, the present study aimed to compare the dFAT, the LN34 singleplex and the LN34 multiplex laboratorial performance. In the first experiment, the LN34 singleplex assay was tested using 332 animal samples (170 dFAT positive) from Sao Paulo state. The LN34 singleplex assay demonstrated high diagnostic sensitivity (100%) and specificity (96.7%) in comparison to the dFAT, and all dFAT samples positive were concordant with the LN34 singleplex assay. In the second experiment, LN34 multiplex was done in parallel with LN34 singleplex using 211 brain animal samples (102 dFAT positive) from different municipalities in Sao Paulo state. LN34 multiplex assay provided high sensitivity (93.4%) and high specificity (100%) while LN34 singleplex assay presented diagnostic sensitivity and specificity of 100% and 95.3%, respectively. In conclusion,

the LN34 singleplex has great potential to be used as the dFAT confirmatory test and, although it showed similar results, the LN34 multiplex still has lower diagnostic sensitivity than the LN34 singleplex.

**Keywords:** rabies, direct fluorescent antibody test, RT-qPCR, LN34 Pan-*Lyssavirus*, singleplex.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formato e estruturas do vírus da raiva .....	21
Figura 2 - Árvore filogenética representativa das diferentes espécies pertencentes ao gênero Lyssavirus .....	23
Figura 3 - Distribuição mundial das diferentes espécies pertencentes a gênero Lyssavirus .....	24
Figura 4 - Estrutura do genoma do vírus da raiva (RABV) .....	25

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das diferentes espécies pertencentes ao gênero Lyssavirus de acordo com seu filogruppo .....	22
Quadro 2 - Sequências de primers e sonda degenerados do ensaio universal Pan-Lyssavirus LN34 utilizados na técnica de One Step RT-qPCR. ....	41
Quadro 3 - Sequências de primers e sonda de hidrólise para detecção do gene endógeno da $\beta$ -actina utilizados na técnica de RT-qPCR.....	41
Quadro 4 - Preparação do Mix LN34 para o RT-qPCR Singleplex.....	42
Quadro 5 - Preparação do Mix $\beta$ -actina para o RT-qPCR Singleplex .....	43
Quadro 6 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da PCR em tempo real <i>one-step</i> no aparelho de PCR em tempo real 7500 Real-Time PCR. ....	43
Quadro 7 - Classificação do C <sub>q</sub> (ciclos de quantificação) das amostras submetidas ao ensaio LN34 Pan-Lyssavirus One-Step RT-qPCR.....	43
Quadro 8 - Sequência de primers utilizados nas reações de transcrição reversa e de PCR convencional.....	44
Quadro 9 - Preparação do Mix da Transcrição Reversa do PCR convencional.....	45
Quadro 10 - Condições de tempo e temperatura, e número de ciclos para a amplificação pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional .....	46
Quadro 11 - Preparação do Mix do PCR convencional.....	46
Quadro 12 - Mix da reação de sequenciamento das amostras .....	48
Quadro 13 - Mix do controle da reação de sequenciamento pGEM.....	48
Quadro 14 -Condições de tempo e temperatura, e número de ciclos para a amplificação pelo método da reação de sequenciamento.....	48

Quadro 15 - Sequência de primers e sonda utilizados nos ensaios de qPCR para caracterização de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV .....	50
Quadro 16 - Mix da reação de PCR em tempo real (qPCR) para caracterização de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV .....	50
Quadro 17 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da qPCR no aparelho de PCR em tempo real 7500 Real-Time PCR .....	50
Quadro 18 - Resultados que apresentaram divergências entre a prova padrão ouro imunofluorescência direta (IFD) e RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus .....	53
Quadro 19 - Resultados que apresentaram divergências entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus .....	55
Quadro 20 - Preparação do Mix para o One-Step RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato multiplex .....	69
Quadro 21 - Resultados que apresentaram divergências entre a prova padrão ouro imunofluorescência direta (IFD) e RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus nos formatos singleplex e multiplex .....	74



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de amostras de SNC provenientes de diferentes animais (classificadas nas diferentes espécies, gêneros, famílias e ordens) e seus respectivos resultados da prova de imunofluorescência direta (IFD), provenientes do serviço de vigilância laboratorial da raiva do Instituto Pasteur no período de abril de 2018 a novembro de 2020. ....	38
Tabela 2 - Amostras de morcegos que foram utilizadas no estudo classificadas em família/espécies, e seus respectivos resultados na técnica de imunofluorescência direta (IFD).. ....	39
Tabela 3 - Comparação entre a imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para detecção do RABV em 332 amostras de SNC.....	52
Tabela 4 - Comparação entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para detecção do RABV em 302 amostras de SNC.....	54
Tabela 5 - Comparação entre a técnica de imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>singleplex</i> para detecção do RABV em 211 amostras de SNC. ....	70
Tabela 6 - Comparação entre a técnica de imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>multiplex</i> para detecção do RABV em 211 amostras de SNC. ....	71
Tabela 7 - Comparação entre o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>singleplex</i> e no formato <i>multiplex</i> para detecção do RABV em 211 amostras de SNC. ....	72
Tabela 8 - Comparação entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>singleplex</i> para detecção do RABV em 201 amostras de SNC.....	73
Tabela 9 - Comparação entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>multiplex</i> para detecção do RABV em 201 amostras de SNC. ....	74

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>Capítulo 1 - Análise do desempenho da imunofluorescência direta e do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil</b> .....	30
<b>1.1 RESUMO</b> .....	31
<b>1.2 INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>1.3 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>1.4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
1.4.1 Material .....	36
1.4.2 Métodos .....	40
<b>1.5 RESULTADOS</b> .....	52
<b>1.6 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>1.7 CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>1.8 REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>Capítulo 2 - Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus <i>multiplex</i> para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil</b> .....	61
<b>2.1 RESUMO</b> .....	62
<b>2.2 INTRODUÇÃO</b> .....	64
<b>2.3 OBJETIVOS</b> .....	66
<b>2.4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
2.4.1 Material .....	67
2.4.2 Métodos .....	67
<b>2.5 RESULTADOS</b> .....	69
2.5.1 Comparação dos resultados entre a técnica de imunofluorescência direta e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>singleplex</i> .....	69
2.5.2 Comparação dos resultados entre a técnica de imunofluorescência direta e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>multiplex</i> .....	70
2.5.3 Comparação dos resultados entre os ensaios RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus nos formatos <i>singleplex</i> e <i>multiplex</i> .....	71
2.5.4 Comparação dos resultados entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>singleplex</i> .....	72
2.5.5 Comparação dos resultados entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato <i>multiplex</i> .....	73
<b>2.6 DISCUSSÃO</b> .....	75

<b>2.7 CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>2.8 REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>3. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	81
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	82
<b>5. ANEXO A</b> .....	85

## INTRODUÇÃO GERAL

A raiva é considerada uma das doenças mais antigas e letais conhecidas pela humanidade. Há tábuas cuneiformes datadas de 1930 a.C. (Leis Suméricas de Eshnunna) que expõe as leis vivenciadas pela população da época. Elas indicam que essa enfermidade já era grandemente conhecida e frequente na população, visto que havia leis que ordenavam ressarcimento monetário no caso de morte por mordedura de cão (TARANTOLA, 2017; YUHONG, 2001)

*(...) If a dog becomes rabid and the ward authority makes that known to its owner, but he does not watch over his dog so that it bites a man and causes his deaths, the owner of the dog shall pay forty shekels of silver; if it bites a slave and causes his death, he shall pay fifteen shekels of silver (GOETZE, 1951; YUHONG, 2001)*

*(..) Se um cão se torna raivoso e a autoridade da região comunica isso ao seu dono, mas ele não vigia o seu cachorro e ele morde um homem e causa sua morte, o dono do cachorro deve pagar quarenta shekels de prata; se ele morde um escravo e causa sua morte, ele deve pagar quinze shekels de prata (GOETZE, 1951; YUHONG, 2001).*

A palavra raiva é oriunda do latim *Rabere* que significa “ser louco” ou do antigo idioma indiano (*Sanskrit*) *Rabbahs* que significa “ser violento” (EL-SAYED, 2018; FISHBEIN; ROBINSON, 1993; LEUNG; DAVIES; HON, 2007). A origem da palavra condiz com a doença, pois os indivíduos acometidos por essa enfermidade geralmente apresentam e demonstram sinais de loucura, violência, alteração de comportamento, irritabilidade e nervosismo (YUHONG, 2001).

O agente etiológico responsável por essa doença é um vírus, conhecido como vírus da raiva. No inglês, esse vírus é chamado de *rabies virus* e, por esse motivo, a sigla comumente utilizada para representá-lo é RABV (JACKSON, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A raiva é uma zoonose que causa uma encefalomielite progressiva aguda, e estima-se que mais de 59.000 pessoas morram por ano no mundo vítimas dessa doença, sendo que a maioria delas são oriundas de países em desenvolvimento onde não há livre acesso à assistência médica (HAMPSON et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Além de humanos, muitos animais também contraem a doença e morrem, o que gera um prejuízo socioeconômico de 8,6 bilhões de dólares por ano devido à, principalmente, perda prematura de produtividade humana e animal (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2019). Todos os mamíferos são suscetíveis ao vírus e, mesmo tendo ciência dos impactos da doença por quase quatro mil anos, essa é uma enfermidade negligenciada (RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

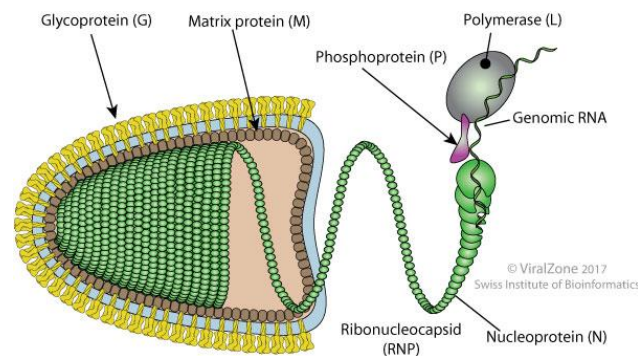
Essa é uma moléstia que possui letalidade de quase 100%, mas que pode facilmente ser prevenida através da vacinação (profilaxia de pré e pós-exposição) (FRANKA et al., 2013; HAMPSON et al., 2015). Contudo, uma vez que o vírus infecta o sistema nervoso central (SNC) do indivíduo, não há nenhum tratamento de cura eficaz (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015; FOOKS; JACKSON, 2020).

Como a doença apresenta alta mortalidade e letalidade, e não há lesão ou sinal clínico patognomônico, é de extrema importância que o diagnóstico da mesma seja realizado através de técnicas laboratoriais fidedignas. Por conseguinte, conhecer o agente etiológico responsável pela doença é imprescindível (FOOKS, 2018; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*) (ICTV, 2022), o RABV é classificado no super-reino *Viruses*, domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae*, subfamília *Alpharhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* e espécie *Lyssavirus rabies*.

Os vírus que pertencem a família *Rhabdoviridae* tem como característica o formato de “bala de revólver” (Figura 1), e aqueles que pertencem ao gênero *Lyssavirus* são patógenos que causam encefalites, fazendo com que seu hospedeiro apresente sintomatologia neurológica semelhantes a raiva (“*rabies like encephalitis*”). Em virtude disso, esse gênero foi nomeado em homenagem à deusa grega da loucura (*Lyssa* ou *Lytta*) (MORI, 2020).

Figura 1 - Formato e estruturas do vírus da raiva



Glicoproteína (G); Proteína Matriz (M); Fosfoproteína (P); Polimerase (L); Nucleoproteína (N); Ribonucleocapsídeo (RNP).  
 Fonte: ViralZone [www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone) (VIRALZONE, 2022), Swiss Institute of Bioinformatics

O gênero *Lyssavirus* possui 17 espécies que atualmente estão agrupadas em três grupos filogenéticos. Esses grupos são formados de acordo com a similaridade genética do ecto-domínio da proteína G e reatividade sorológica cruzada das diferentes espécies de vírus (BADRANE et al., 2001). No momento atual, os três filogrupos estão agrupados como a seguir (Quadro 1 e Figura 2): a) Filogrupo I (*Lyssavirus aravan*, *Lyssavirus australis*, *Lyssavirus bokeloh*, *Lyssavirus duvenhage*, *Lyssavirus hamburg*, *Lyssavirus helsinki*, *Lyssavirus gannoruwa*, *Lyssavirus irkut*, *Lyssavirus khujand*, *Lyssavirus rabies* e *Lyssavirus formosa*); b) Filogrupo II (*Lyssavirus lagos*, *Lyssavirus mokola* e *Lyssavirus shimonî*); c) Filogrupo III/IV (*Lyssavirus ikoma*, *Lyssavirus lleida* e *Lyssavirus caucasicus*) (ICTV, 2022; OLIVEIRA et al., 2020).

Contudo, há um outro vírus (*Kotalahti bat lyssavirus*) que ainda não foi oficialmente classificado, mas apresenta grande similaridade com as características do filogrupo I. Sendo assim, ele se encontra temporariamente classificado nesse filogrupo (NOKIREKI et al., 2018; ICTV, 2022).

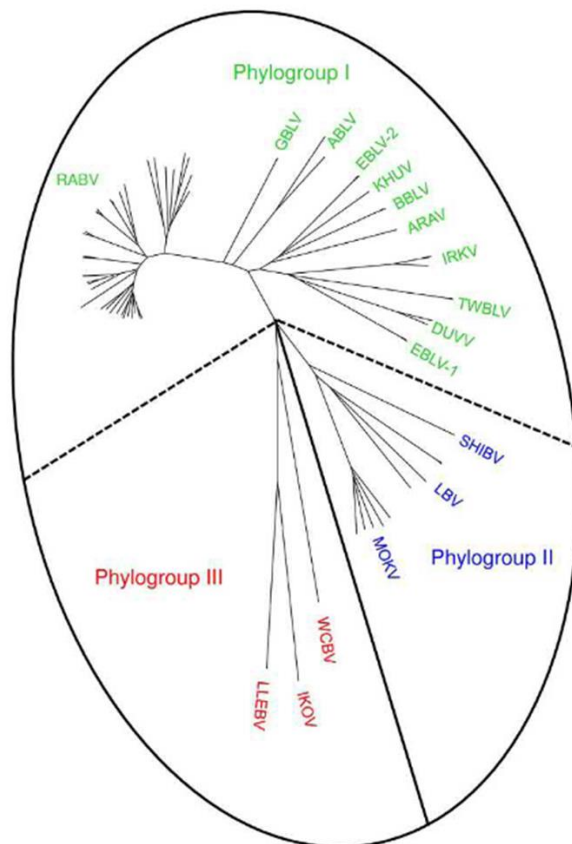
Quadro 1 - Classificação das diferentes espécies pertencentes ao gênero *Lyssavirus* de acordo com seu filogrupo

<b>Filogrupo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Vírus</b>	<b>Abreviação</b>
<b>1</b>	Lyssavirus aravan	Aravan virus	ARAV
	Lyssavirus australis	Australian bat lyssavirus	ABLV
	Lyssavirus bokeloh	Bokeloh bat lyssavirus	BBLV
	Lyssavirus duvnhage	Duvnhage virus	DUVV
	Lyssavirus hamburg	European bat lyssavirus 1	EBLV-1
	Lyssavirus helsinki	European bat lyssavirus 2	EBLV-2
	Lyssavirus gannoruwa	Gannoruwa bat lyssavirus	GBLV
	Lyssavirus irkut	Irkut virus	IRKV
	Lyssavirus khujand	Khujand virus	KHUV
	*	Kotalahti bat lyssavirus*	KBLV
	Lyssavirus rabies	rabies virus	RABV
	Lyssavirus formosa	Taiwan bat lyssavirus	TWBLV
<b>2</b>	Lyssavirus lagos	Lagos bat virus	LBV
	Lyssavirus mokola	Mokola virus	MOKV
	Lyssavirus shimoni	Shimoni bat virus	SHIBV
<b>3</b>	Lyssavirus ikoma	Ikoma lyssavirus	IKOV
	Lyssavirus lleida	Lleida bat lyssavirus	LLEBV
	Lyssavirus caucasicus	West Caucasian bat virus	WCBV

\*Espécie candidata ao gênero *Lyssavirus*., então ainda não possui nome oficial.

Fonte: (BANYARD et al., 2011; HU et al., 2018; ICTV, 2022; NOKIREKI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017)

Figura 2 - Árvore filogenética representativa das diferentes espécies pertencentes ao gênero *Lyssavirus*



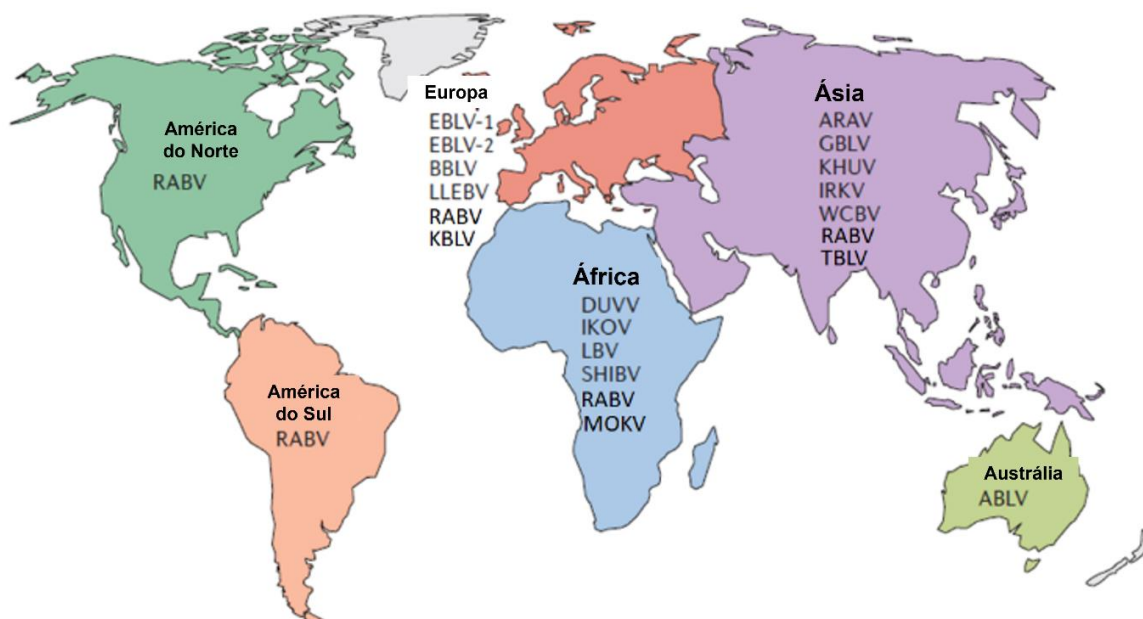
\*A espécie *Kotalahti bat lyssavirus (KBLV)* não foi inserida visto que seu genoma ainda não foi classificado

Fonte: Fooks e Jackson (2020)

As diferentes espécies pertencentes ao gênero *Lyssavirus* estão presentes no mundo inteiro. No entanto, algumas espécies foram encontradas somente em determinadas regiões, como o *Lyssavirus australis (ABLV)*, que foi encontrado apenas na Austrália e sudeste da Ásia. Em contrapartida, há vírus que podem ser facilmente encontrados em diversos países pelo mundo, como o RABV, que só está ausente na Oceania e Antártica. Inclusive, o único *Lyssavirus* atualmente presente nas Américas é o RABV conforme mostra a Figura 3 (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).



Figura 3 - Distribuição mundial das diferentes espécies pertencentes a gênero *Lyssavirus*



Fonte: (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018) (adaptada)

Todos os vírus pertencentes à ordem *Mononegavirales* são vírus RNA senso negativo e utilizam RNA polimerase para se replicarem. Portanto, todos estão sujeitos a diversas mutações visto que ela não possui um mecanismo de correção de inserção de nucleotídeos (HOLLAND et al., 1982; LAURING; ANDINO, 2010; STEINHAUER; HOLLAND, 1987). Sendo assim, o RABV apresenta populações de diferentes sequências genéticas, chamadas de variante antigênica e/ou linhagem genética (FOOKS; JACKSON, 2020).

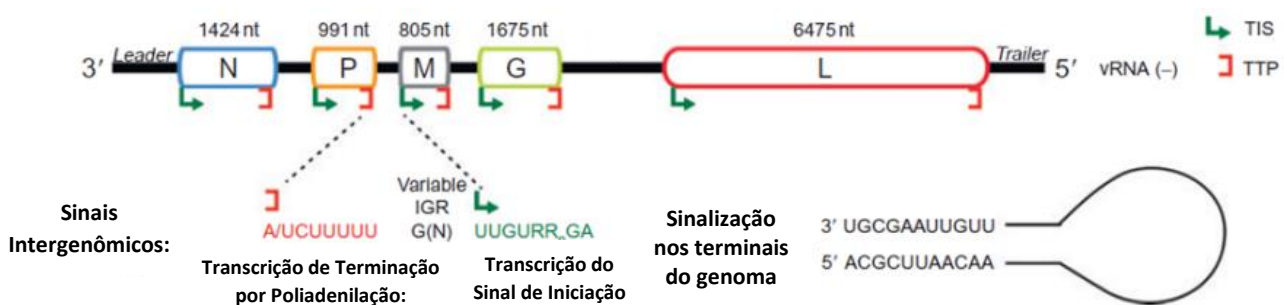
As lissaviruses são compostas por proteínas, lipídios, carboidratos e RNA. As proteínas compõem 67-74% da massa total, os lipídios 20-26%, os carboidratos 3%, e o RNA 2-3% (FOOKS; JACKSON, 2020). A “bala de projétil” (RABV) possui 200 nm de comprimento por 80 nm de largura, aproximadamente (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Esse gênero possui genoma com cerca de 12.000 nucleotídeos, RNA fita simples não segmentado e de senso negativo (-ssRNA) (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; FAUQUET et al., 2005; RIEDEL; HENNRICH; CONZELMANN, 2020). Por essa afirmação, subentende-se que o RNA genômico não é infeccioso (FOOKS; JACKSON, 2020). Além disso, esse material genético possui cinco genes monocistrônicos que codificam as cinco proteínas estruturais do vírus (N,

P, M, G e L), também respectivamente conhecidas como nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de matriz, glicoproteína e RNA polimerase RNA-dependente (FAUQUET et al., 2005; FOOKS; JACKSON, 2020).

Juntamente ao RNA, as proteínas N, P e L formam a ribonucleoproteína (RNP), que é o componente ativo na transcrição e replicação viral. O esqueleto do vírus é formado pela interação do RNP, mais especificamente a proteína N, e a proteína M, pois elas estabilizam a estrutura viral (GUICHARD et al., 2011; MEBATSION; WEILAND; CONZELMANN, 1999). Ademais, o vírus é envelopado e este é composto pelas proteínas G e M, formando uma bicamada lipídica (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; FAUQUET et al., 2005; FOOKS; JACKSON, 2020). Entre as lissavíroses, as proteínas P e G possuem sequências intergenômicas variadas, enquanto as proteínas L, M e N possuem grande semelhança em sua estrutura e comprimento (MARSTON et al., 2007).

O genoma do RABV é organizado na ordem 3'-N-P-M-G-L-5', e ainda possui pequenas sequências regulatórias no início (região *leader* 3') e no final (região *trailer* 5') do genoma (Figura 4). A região *leader* possui 58 nucleotídeos invariavelmente, sendo que os nove primeiros são idênticos em todas as lissavíroses, e a região *trailer* possui 70 nucleotídeos, aproximadamente (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011).

Figura 4 - Estrutura do genoma do vírus da raiva (RABV)



Os cinco genes são separados por regiões intergênicas. As regiões “*leader*” e “*trailer*” são as regiões regulatórias e cada gene possui o TIS (sinaliza a transcrição inicial) e o TTP (sinaliza a terminação da transcrição)

Fonte: Albertini; Ruigrok; Blondel (2011) (Adaptada)

A extremidade 3' (região *leader*) é o promotor gênico e, portanto, é onde se inicia a transcrição monocistrônica dos RNAm, obrigatoriamente (FOOKS; JACKSON, 2020). Durante a transcrição, a RNA polimerase não transcreve o gene por completo, pois cada um dos cinco genes possui regiões que não são codificadas. Essas regiões servem para sinalizar à RNA polimerase onde o gene começa a ser transcrito (sinalização de transcrição inicial) e onde encerra a transcrição do gene (sinalização por poliadenilação da terminação da transcrição) conforme mostra a Figura 4 (TORDO et al., 1986). Em toda sinalização de início, a RNA polimerase se associa ao material a ser transcrito e, em toda sinalização de encerramento, ela se dissocia (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011; FOOKS; JACKSON, 2020).

Essas inúmeras associações e dissociações da RNA polimerase juntamente à transcrição ser sempre realizada no sentido 3'-N-P-M-G-L-5', leva a formação de um gradiente de transcrição. Os genes mais próximos à região 3' apresentam maiores quantidades de RNAm do que os genes mais distantes à região 3'. Por conseguinte, a proteína N é a proteína em maior abundância, seguida das proteínas P, M, G e L (FOOKS; JACKSON, 2020).

Além de ser a mais abundante, a proteína N é oriunda de um gene que possui sua sequência de nucleotídeos muito conservada (MARSTON et al., 2007; WARRILOW et al., 2002). Essa proteína estimula a imunidade celular e humoral do hospedeiro, além de também influenciar a transcrição e a replicação (FAUQUET et al., 2005).

A proteína P também possui função na transcrição e replicação, porém ela também é a responsável por impedir que a proteína N se agregue com outras moléculas de RNA presentes no vírus. Ademais, essa proteína é uma das menos conservadas e estimula a imunidade celular do hospedeiro (FAUQUET et al., 2005; MASTERS; BANERJEE, 1988).

A proteína M consegue interferir na fosforilação e na exportação de RNAm do núcleo do hospedeiro. Isso inibe a transcrição e tradução da célula hospedeira. Ela também é a responsável pelo formato de "bala de revólver" do vírus, visto que ela é quem faz a condensação do nucleocapsídeo (FAUQUET et al., 2005; RIEDEL; HENNRICH; CONZELMANN, 2020).

A grande responsável pela ligação do vírus com a célula hospedeira é a proteína G. Após interagir com os receptores celulares do hospedeiro, ela induz à

endocitose e fusão do vírus com o hospedeiro. Essa proteína consegue neutralizar os anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro (FAUQUET et al., 2005).

A encarregada da maior parte das reações enzimáticas realizadas, como a transcrição e replicação, é a RNA polimerase. Esse componente enzimático é codificado pelo gene L, dando origem à proteína L (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011).

Como mencionado anteriormente, esse vírus causa uma doença quase letal e, por isso, o diagnóstico da mesma deve ser dado o mais rápido possível e com alto grau de confiabilidade para que as medidas profiláticas e epidemiológicas sejam empregadas da melhor forma possível. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomendam a Imunofluorescência Direta (IFD) como o padrão ouro para o diagnóstico de raiva *post-mortem* (FOOKS, 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018).

Essa técnica foi eleita como padrão ouro devido sua alta sensibilidade, especificidade e também rapidez (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996; GERMANO et al., 1977). Contudo, como qualquer outra técnica de diagnóstico, ela possui algumas limitações. Sua acurácia está diretamente relacionada com: habilidade e experiência do laboratorista para distinguir amostra inespecífica de amostra positiva; a qualidade do conjugado antirrábico utilizado na reação antígeno-anticorpo; acesso e qualidade do microscópio de fluorescência; e estado de conservação das amostras, visto que amostras em decomposição ou desnaturadas reduzem sua sensibilidade (ARAÚJO et al., 2008; DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996).

Sabendo-se disso, é preconizado que, além da técnica primária de IFD, faça-se um teste confirmatório. Entre os diferentes métodos que podem e são utilizados como testes confirmatórios como o isolamento viral em cultivo celular ou camundongo, imunofluorescência indireta e teste rápido de imunohistoquímica direta, a técnica molecular RT-PCR é muito utilizada para confirmar o diagnóstico, especialmente em amostras de equinos (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018).

Não obstante, como esperado, essa técnica molecular possui limitações e cuidados. Qualquer laboratório que realize esse tipo de método, deve possuir um gerenciamento e fluxo de qualidade bem estabelecido no setor com o intuito de reduzir a contaminação por amplicons, resultados falso-positivos e falso-negativos. É comum ocorrer resultados falso-positivos em laboratórios que realizam *nested* PCR

ou *semi-nested* PCR, pois os amplicons podem acabar contaminando as demais amostras negativas. No caso dos resultados falso-negativos, eles geralmente ocorrem devido à alguma falha em um dos processos anteriores (extração, transcrição reversa e amplificação) ou devido a amostras que possuem substâncias inibidoras (como por exemplo fenol) (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019)

Uma evolução do RT-PCR é o RT-qPCR (Real Time RT-PCR), que é um método mais rápido, visto que utiliza fragmentos menores que do RT-PCR e não há necessidade de executar a etapa posterior de eletroforese. Inclusive, toda as reações moleculares ocorrem dentro de um tubo fechado, reduzindo grandemente as chances de contaminação cruzada, o que, conseqüentemente, acarreta menor número de resultado falso-positivo (MCELHINNEY et al., 2020; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

Recentemente, foi desenvolvido, pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta-EUA, um conjunto de primers degenerados e sonda de hidrólise (Taqman) denominada LN34 Pan-*Lyssavirus* composto por bases modificadas por LNA (do inglês locked nucleic acid, ácido nucleico bloqueado) capaz de detectar de modo universal todas as espécies de *Lyssavirus*. Este teste de RT-qPCR tem tido resultados promissores e tem sido preconizado pela OMS como teste confirmatório para o diagnóstico da raiva (GIGANTE et al., 2018; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019; WADHWA et al., 2017).

## OBJETIVOS

- Demonstrar o potencial do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* de ser utilizado como teste confirmatório a técnica de imunofluorescência direta (padrão-ouro) no diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais.
- Constatar se o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* demonstra qualidades para substituir a técnica de isolamento viral em cultivo de células como teste confirmatório à IFD.
- Comparar o desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* nos formatos *singleplex* e *multiplex*.

## Capítulo 1

**Análise do desempenho da imunofluorescência direta e do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil**

## 1.1 RESUMO

A raiva é uma doença causada por um vírus (RABV) em que, uma vez apresentado sinais neurológicos, quase 100% dos casos evoluem ao óbito. Consequentemente, é uma enfermidade devastadora que possui grande impacto social. Por esse motivo, é imperativo que seu diagnóstico seja realizado da forma rápida, prática e que apresente resultados fidedignos. Devido a sua rapidez e alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, a OMS preconiza a Imunofluorescência Direta (IFD) como a prova padrão ouro para diagnosticar a raiva post-mortem. Como qualquer outra técnica diagnóstica, a IFD possui fatores que podem reduzir sua sensibilidade. Sendo assim, o RT-qPCR ensaio do LN34 Pan-*Lyssavirus* foi desenvolvido como teste confirmatório à IFD e tem apresentado resultados promissores. No entanto, ainda não há muitos estudos utilizando tal ferramenta que comprovem sua sensibilidade e especificidade em amostras brasileiras, que possuem variantes e linhagens genéticas únicas do RABV. O objetivo desse trabalho foi comparar o desempenho diagnóstico da IFD e do ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* em amostras brasileiras de sistema nervoso central (SNC). 332 amostras de SNC foram utilizadas para realizar o diagnóstico de raiva de animais post-mortem. Dessas 332 amostras, 170 foram positivas e 162 negativas pela IFD. Já no ensaio de RT-qPCR LN34 o RNA viral do RABV foi detectado em 181 amostras (176 positivas e 5 inconclusivas) e ausência de detecção em 151 amostras. A IFD apresentou sensibilidade e especificidade diagnóstica de 96,5% e 100%, respectivamente. O ensaio do LN34 Pan-*Lyssavirus* apresentou sensibilidade e especificidade diagnóstica de 100% e 96,7%, respectivamente, considerando cinco resultados inconclusivos. Conclui-se que o ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus* possui grande potencial de ser utilizado como prova confirmatória à IFD, visto que detectou o vírus do RABV em amostras com baixa carga viral, procedentes de diferentes espécies de animais e diferentes linhagens e variantes do vírus.

**Palavras-chave:** Raiva. Imunofluorescência direta. RT-qPCR. Ensaio LN34 Pan-*Lyssavirus*. Diagnóstico laboratorial.



## ABSTRACT

Rabies is a disease caused by a virus (RABV) and, once neurological signs present, almost 100% of the cases evolve to death. Consequently, it is a calamitous disease that has social impact. Thus, it is crucial that its diagnosis must be easy and fast to perform and have an accurate result. Due to its speed and high diagnostic sensitivity and specificity, the WHO recommends the direct fluorescent antibody test (dFAT) as the gold standard technique to diagnosis post-mortem rabies. As any other diagnostic method, dFAT has some circumstances that might decrease its sensitivity. Therefore, the LN34 Pan-*Lyssavirus* RT-qPCR assay was developed as a confirmatory test for dFAT, and it has shown promising results. However, there are not many studies using such tool proving its sensitivity and specificity in Brazilian samples yet, and these have unique RABV genetic sequences. This study aimed to compare the dFAT and LN34 assay results performance in Brazilian central nervous system (CNS) samples. 332 CNS samples were used to diagnosis rabies in post-mortem animals. From the 332 samples, 170 were positive and 162 were negative in the dFAT. On the other hand, the LN34 assay detected the RABV virus in 181 samples (176 positive and five inconclusive) and absence of detection in 151 samples. The dFAT presented diagnostic sensitivity and specificity of 96.5% and 100%, respectively. The LN34 assay presented sensitivity and specificity of 100% and 96.7%, respectively, considering five inconclusive results. In conclusion, the LN34 assay has great potential to be used as a confirmatory test of dFAT, since it detected the RABV virus in low viral load samples, different species and unique RABV genetic sequences.

**Keywords:** Rabies, direct Fluorescent Antibody Test. RT-qPCR. LN34 Pan-*Lyssavirus* assay. Laboratorial diagnosis.

## 1.2 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença de elevada letalidade, na qual quase 100% dos casos evoluem a óbito uma vez que apareçam as manifestações neurológicas, o que exige um diagnóstico rápido, de baixo custo e acurado (HAMPSON et al., 2015; HEMACHUDHA; LAOTHAMATAS; RUPPRECHT, 2002). Embora existam diversas técnicas para diagnosticar a raiva, poucas apresentam essas características. Na realidade, mesmo as técnicas mais utilizadas também apresentam limitações, como qualquer outra prova de diagnóstico. Consequentemente, a utilização de diferentes técnicas associadas tem a finalidade de aumentar a precisão no diagnóstico dessa enfermidade (GERMANO et al., 1977).

Uma imprecisão no resultado, como falso negativo, poderia acarretar como efeito lamentável um óbito humano, na ausência da adoção de condutas médicas preconizadas no esquema de profilaxia pós-exposição da raiva (CENTOAMORE, 2017). O diagnóstico laboratorial da raiva influencia diretamente na adoção de medidas de prevenção em pacientes humanos e nas providências a serem praticadas no controle de um foco positivo de raiva animal (MESLIN; KAPLAN, 1996).

O padrão ouro de diagnóstico da raiva recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a técnica de imunofluorescência direta (IFD), que possui alta sensibilidade e especificidade diagnósticas entre 95 a 100% (DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996). Entretanto, alguns fatores podem reduzir esses parâmetros, influenciando o limiar de detecção do antígeno viral, tais como: 1) o estado de conservação da amostra de sistema nervoso central (SNC) que pode causar degradação do antígeno viral; 2) eficácia do anticorpo conjugado antirrábico (CAR) no reconhecimento do antígeno viral; 3) qualidade do microscópio de fluorescência; 4) qualidade dos insumos (lâminas, lamínulas e reagentes); 5) subjetividade na leitura das lâminas, minimizada pela experiência do profissional (ARAÚJO et al., 2008; DEAN; ABELSETH; ATANASIU, 1996; WADHWA et al., 2017).

Sabe-se que o vírus da raiva (RABV) não se dissemina uniformemente pelo SNC (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018). Amostras de SNC “não representativas” com inexistência de porções importantes para diagnóstico da raiva (cerebelo, tronco encefálico e hipocampo) podem ser determinantes para essa oscilação da carga viral (CENTOAMORE et al., 2020; DETTINGER et al., 2021; SOUZA, 2019; STEIN et al., 2010).

Por um longo período, o hipocampo foi considerado a melhor região para fazer o diagnóstico da raiva, pois era a região que apresentava maior facilidade de se encontrar corpúsculos de Negri (LEPINE; ATANASIU, 1996; TIERKEL, 1973). No entanto, diversos autores constataram que a estrutura mais indicada para o diagnóstico da raiva pela técnica de IFD em qualquer espécie é o tronco encefálico, especialmente o tálamo e mesencéfalo, devido sua maior intensidade antigênica (BINGHAM; VAN DER MERWE, 2002; CARRIERI et al., 2006; CENTOAMORE et al., 2020).

Vários autores verificaram que os equinos apresentam menor sensibilidade à IFD no diagnóstico da raiva, indicando a importância do uso de testes confirmatórios nesta espécie animal (BASSUINO et al., 2016; PEIXOTO et al., 2000; SOUZA, 2019).

O isolamento viral, tanto em camundongos (IVC) como em cultivo de células (IVCC), tem sido recomendado pela OMS como teste confirmatório do diagnóstico da raiva pela IFD, pois pode detectar o RABV em amostras com baixa carga viral (MESLIN; KAPLAN, 1996). O isolamento viral aumenta a concentração do patógeno, isso porque o vírus se replica nas células neuronais, podendo assim apresentar resultados positivos mesmo em situações nas quais em outras técnicas (como por exemplo a IFD) tiveram laudos negativos (CENTOAMORE, 2017). Castilho et al. (2007), em estudo realizado em amostras de quirópteros, concluíram que o IVCC é uma técnica sensível, rápida, de baixo custo, requerendo menor espaço para sua execução que o IVC. O IVCC tem sido recomendado como método alternativo visando à substituição e redução no uso dos animais de experimentação. Apesar dessas vantagens, essa técnica foi implementada em poucos laboratórios na América Latina (NASRAUI, 2020), como por exemplo, o Instituto Pasteur de São Paulo (CASTILHO et al., 2007), o Laboratório de Saúde Pública do Chile (YUNG et al., 2018) e o Instituto Pasteur da Argentina (LA ROSA et al., 2018).

Essas dificuldades podem ser explicadas pelas desvantagens do IVCC, como descrito a seguir: 1) necessidade de equipamentos de qualidade como cabines de segurança biológica (para inoculação viral), estufas de CO<sub>2</sub> (para manutenção e incubação celular) e microscópio invertido de fluorescência para leitura; 2) técnica exige profissionais capacitados; 3) exigência de insumos de qualidade como meios de cultura e CAR; 4) subjetividade na leitura das placas de cultura, minimizada pela experiência do profissional (CENTOAMORE, 2017).

Outro fator de impacto que altera a sensibilidade do IVCC é a decomposição e desnaturação do tecido nervoso. Quando o animal morre, é esperado que o processo de autólise se inicie, sobretudo no SNC. Esse quadro de decomposição pode se agravar caso o material não seja rapidamente refrigerado/congelado, ou caso passe por repetidos ciclos de congelamento/descongelamento (ARAÚJO et al., 2008; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018).

Rudd e Trimarchi (1989) constataram que o processo da decomposição pode alterar o resultado diagnóstico do IVCC, visto que o vírus precisa estar viável para infectar as células hospedeiras. Por possuir envelope, o RABV é sensível a variações de temperatura, podendo apresentar resultados negativos no IVCC mesmo sendo positivos para outras técnicas. Além disso, alguns autores mencionam que a cultura de células é mais susceptível a citotoxicidade e contaminação bacteriana, apresentando nesses casos diminuição da detecção do RABV pelo IVCC (KUZMIN, 2015; SOUZA et al., 2015).

Gigante et al. (2018) apresentaram um estudo multi-laboratorial utilizando 2.978 amostras animais (mais de 60 espécies) provenientes de quatro continentes (África, Américas, Ásia e Europa) que foram testadas para raiva tanto para o padrão ouro (IFD) quanto para o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*. Esta técnica apresentou alta sensibilidade e especificidade diagnósticas de 99,9% e 99,68%, respectivamente. Neste levantamento, a RT-qPCR LN34 foi capaz de identificar quase a totalidade das amostras positivas para IFD e produziu resultados definitivos mesmo naquelas em estado de decomposição, que eram inconclusivas para IFD. Além disso, a RT-qPCR LN34 não gerou resultados falso-negativos, e apresentou número reduzido de resultados falso-positivos ou inconclusivos.

Muitos laboratórios de Saúde Pública realizam rotineiramente RT-qPCR para detecção de outros patógenos (como influenza vírus, zika vírus, HIV, vírus da dengue, SARS-Cov-2) e já possuem equipamentos e experiência para implementar esse teste de RT-qPCR para raiva. Se a RT-qPCR fosse realizada rotineiramente em todas as amostras como teste confirmatório à IFD, poderia melhorar a sensibilidade e aumentar a capacidade dos laboratórios de detectar casos de raiva com maior rapidez e nas situações com distribuição de antígenos extremamente esparsa e não uniforme (falsos negativos na IFD) (DETTINGER et al., 2021).

Estudo preliminar realizado por Chierato (2021) confirmou o caráter universal na detecção das diferentes variantes e linhagens virais do RABV circulantes no Brasil.

Este presente trabalho é pioneiro no Brasil na utilização do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* como teste confirmatório à IFD no diagnóstico da raiva. O intuito deste trabalho foi de observar a performance do ensaio e analisar se ele é consistente e apresenta resultados fidedignos para poder ser utilizado como uma técnica confirmatória na rotina diagnóstica no Brasil.

### 1.3 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi o de comparar o desempenho diagnóstico entre as provas padrão ouro imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* One Step em 332 amostras de SNC procedentes de diferentes espécies animais encaminhados ao Instituto Pasteur de São Paulo para vigilância laboratorial da raiva.

### 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 1.4.1 Material

O TDR Diagnostic Evaluation Expert Panel et al. (2010) publicaram recomendações sobre o cálculo de amostras para a validação de testes diagnósticos. Considera-se o valor da sensibilidade (ou especificidade) em 90% e um intervalo de confiança de 95%, sendo assim, supõe-se que:

$n$  = número de amostras positivas

$p$  = 0,9 (valor estimado da sensibilidade ou especificidade) e

$x$  = 0,05 ( $\pm 5\%$ ) Aplicando-se tais valores na seguinte fórmula,

temos que:

$$n = \frac{(1,96)^2 [p (1-p)]}{x^2} = \frac{(1,96)^2 0,9 (1 - 0,9)}{(0,05)^2} \cong 138 \text{ amostras}$$

Sendo assim, de acordo com o cálculo seriam necessárias pelo menos 138

amostras positivas diagnosticadas pelo método de referência (IFD) para medir a sensibilidade dentro do intervalo de confiança a 95%. De modo semelhante refere-se ao número de amostras mínimo negativas (n=138) diagnosticadas pelo método de referência para medir a especificidade dentro do intervalo de confiança de 95%. Com base nesses cálculos, o número mínimo a ser analisado seria de 276 amostras.

Durante o período de abril de 2018 a novembro de 2020, foram utilizadas 332 amostras clínicas de sistema nervoso central (SNC) de diferentes espécies de animais encaminhados ao Instituto Pasteur de São Paulo para vigilância laboratorial da raiva (Tabela 1). No total, 169 animais domésticos e 163 animais silvestres foram utilizados. Importante ressaltar que das 332 amostras utilizadas, 170 amostras foram positivas e 162 amostras foram negativas pelo padrão ouro (IFD) (Tabela 1).

Os 122 morcegos utilizados foram classificados em três diferentes famílias (*Molossidae*, *Phyllostomidae* e *Vespertilionidae*) ou como não identificado, na ocorrência de não ser possível identificar a família devido ao estado de autólise do animal (Tabela 2). Além dessa classificação, esses animais também foram identificados de acordo com suas espécies (Tabela 2).

Tabela 1 - Total de amostras de SNC provenientes de diferentes animais (classificadas nas diferentes espécies, gêneros, famílias e ordens) e seus respectivos resultados da prova de imunofluorescência direta (IFD), provenientes do serviço de vigilância laboratorial da raiva do Instituto Pasteur no período de abril de 2018 a novembro de 2020.

<b>Espécies<sup>a</sup>/ gêneros<sup>b</sup>/ famílias<sup>c</sup>/ ordens<sup>d</sup></b>	<b>IFD positiva</b>	<b>IFD Negativa</b>	<b>Total</b>
Bovino ( <i>Bos taurus</i> ) <sup>a</sup>	70	18	88
Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> ) <sup>a</sup>	2	18	20
Equino ( <i>Equus ferus caballus</i> ) <sup>a</sup>	18	18	36
Gato ( <i>Felis catus domestica</i> ) <sup>a</sup>	2	16	18
Capivara ( <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> ) <sup>a</sup>	3	1	4
Cutia ( <i>Dasyprocta</i> sp.) <sup>b</sup>	0	1	1
Gambá ( <i>Didelphis</i> sp.) <sup>b</sup>	0	5	5
Javali ( <i>Sus scrofa</i> ) <sup>a</sup>	0	2	2
Lobo-Guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) <sup>a</sup>	1	0	1
Morcego ( <i>Chiroptera</i> ) <sup>d</sup>	66	56	122
Onça ( <i>Panthera onca</i> ) <sup>a</sup>	0	3	3
Ovino ( <i>Ovis aries</i> ) <sup>a</sup>	7	0	7
PNH* ( <i>Primate</i> ) <sup>d</sup>	1	20	21
Tamanduá ( <i>Myrmecophagidae</i> ) <sup>c</sup>	0	1	1
Veado ( <i>Cervidae</i> ) <sup>c</sup>	0	3	3
<b>Total</b>	<b>170</b>	<b>162</b>	<b>332</b>

\*PNH: primata não humano. IFD: imunofluorescência direta.

Tabela 2 - Amostras de morcegos que foram utilizadas no estudo classificadas em família/espécies, e seus respectivos resultados na técnica de imunofluorescência direta (IFD)..

<b>Família/Espécies</b>	<b>IFD Positiva</b>	<b>IFD Negativa</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Família <i>Phyllostomidae</i></b>	<b>31</b>	<b>18</b>	<b>49</b>
<i>Artibeus lituratus</i>	23	12	35
<i>Artibeus planirostris</i>	2	1	3
<i>Carollia perspicillata</i>	0	1	1
<i>Desmodus rotundus</i>	6	0	6
<i>Glossophaga soricina</i>	0	4	4
<b>Família <i>Molossidae</i></b>	<b>15</b>	<b>27</b>	<b>42</b>
<i>Eumops glaucinus</i>	1	7	8
<i>Eumops perotis</i>	0	6	6
<i>Molossus molossus</i>	2	7	9
<i>Molossus rufus</i>	0	3	3
<i>Nyctinomops aurispinosus</i>	0	1	1
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	10	2	12
<i>Nyctinomops macrotis</i>	0	1	1
<i>Tadarida brasiliensis</i>	2	0	2
<b>Família <i>Vespertilionidae</i></b>	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>28</b>
<i>Eptesicus furinalis</i>	10	0	10
<i>Histiotus velatus</i>	0	1	1
<i>Lasiurus blossevilli</i>	1	0	1
<i>Myotis albescens</i>	4	0	4
<i>Myotis nigricans</i>	5	7	12
<b>Não identificado</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>56</b>	<b>122</b>

IFD: imunofluorescência direta



## **1.4.2 Métodos**

### **1.4.2.1 Imunofluorescência Direta**

Na rotina de diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur, faz-se a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) para a pesquisa de antígeno viral do RABV, conforme foi descrito por Dean et. al. (1996). Para isso, o anticorpo monoclonal comercial anti-RABV MAB0051 (Milipore) foi utilizado. A leitura da lâmina foi realizada utilizando o microscópio de fluorescência Zeiss Scope A1-AX10, com aumento de 400x.

### **1.4.2.2 Isolamento Viral em Cultivo Celular**

Na rotina de diagnóstico da raiva do Instituto Pasteur, realiza-se a técnica de Isolamento Viral em Cultivo Celular (IVCC). Para isso, utilizou-se células da linhagem neuroblastomamurino N2A em placas de 96 orifícios de fundo chato, conforme o protocolo de Castilho et. al. (2007). A leitura da reação foi realizada em microscópio invertido Zeiss Observer A1-AX10 de fluorescência com aumento de 200x.

### **1.4.2.3 Extração de RNA total utilizando kit de extração de RNA RNeasy Lipid Tissue Mini**

Todas as 332 amostras de SNC foram extraídas com o kit de extração de RNA *RNeasy Lipid Tissue Mini* (Qiagen) por colunas com membranas de sílica, conforme prescrito pelo fabricante. Após extraído, o RNA foi imediatamente armazenado em freezer a -80°C até ser utilizado. Aproximadamente, 30 mg de encéfalo foram utilizados para a extração de cada amostra.

#### 1.4.2.4. One-Step RT-qPCR Singleplex

Após extração do material genético conforme o item 1.4.2.3, o reagente *AgPath-ID one-step RT-PCR kit* (ThermoFisher Scientific) e o conjunto de primers e sonda do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus One Step* (Quadro 2) foram usados para detectar o RNA do RABV. Ademais, um conjunto de primers e sonda de hidrólise (Quadro 3) também foram utilizados de modo concomitante no *singleplex* para detectar o gene da  $\beta$ -actina, que funciona com um controle endógeno da reação. Todos os reagentes e reações realizados seguiram a metodologia preconizada por Wadhwa et al. (2017).

Quadro 2 - Sequências de primers e sonda degenerados do ensaio universal Pan-*Lyssavirus* LN34 utilizados na técnica de *One Step* RT-qPCR.

Primers/Sonda	Sentido	Sequência (5'-3')	Região*
Primer senso 1	Senso	ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA	1 - 24
Primer senso 2	Senso	ACGCTTAACAACAAAATCADAGAAG	1 – 25
Primer antissenso	Antissenso	CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC	140 – 164
Sonda LN34	Senso	(FAM) AA+C+ACCY+C+T+ACA+A+TGGA (BHQ1)	59 - 75

\*A região de hibridização dos primers é em relação ao genoma completo do vírus fixo PV (número de acesso no GenBank: M13215.1).

O nucleotídeo degenerado está codificado de acordo com as normas da IUPAC (**D**: A ou G ou T; **M**: A ou C; **Y**: C ou T; **R**: A ou G).

Bases modificadas por LNA (do inglês *locked nucleic acid*, ácido nucleico bloqueado): indicadas por um sinal + precedendo a base na sequência (por exemplo, +A, +G, +C, +T).

Quadro 3 - Sequências de primers e sonda de hidrólise para detecção do gene endógeno da  $\beta$ -actina utilizados na técnica de RT-qPCR

Primers/Sonda	Sentido	Sequência (5'-3')
Primer $\beta$ -actina senso	Senso	CGATGAAGATCAAGATCATTGC
Primer $\beta$ -actina antissenso	Antissenso	AAGCATTGCGGTGGAC
Sonda $\beta$ -actina	Senso	(HEX) TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCA (BHQ1)

Para a realização do *One-Step* RT-qPCR, foi necessário a placa de 96 orifícios *MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems™). Os primers e sondas utilizados na preparação do Mix possuíam concentração de 10  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Quadros 4 e 5). Essa concentração se aplica tanto ao LN34 quanto a  $\beta$ -actina. O aparelho usado para a efetuar a reação de *One Step* RT-qPCR (7500 Real-Time PCR) foi submetido ao ciclo descrito no Quadro 6. Em todas as placas, as reações foram utilizadas com controles negativo (água ultrapura) e positivo (vírus fixo CVS), e as amostras clínicas em duplicatas. Analisadas pelo 7500 *Software* Applied Biosystem™, as amostras foram classificadas em positivas, negativas ou inconclusivas de acordo com o número de ciclos de quantificação (Cq). Amostras apresentando Cq menor que 35 foram consideradas positivas; Cq entre 35 e 40 foram classificadas como inconclusivas; e as com Cq maior que 40 foram denominadas negativas (Quadro 7).

Quadro 4 - Preparação do Mix LN34 para o RT-qPCR Singleplex

LN34	Reagentes	$\mu\text{L}/\text{amostra}$
	Água	6,5
	2x RT Buffer	12,5
	25xRT-PCR <i>Enzyme mix</i>	1
	Primer senso 1 [10 $\mu\text{M}$ ]	0,5
	Primer senso 2 [10 $\mu\text{M}$ ]	0,5
	Primer antissenso [10 $\mu\text{M}$ ]	1
	Sonda [5 $\mu\text{M}$ ]	1
	RNA	2
	<b>Total por reação</b>	<b>25<math>\mu\text{L}</math></b>

Quadro 5 - Preparação do Mix  $\beta$ -actina para o RT-qPCR Singlepex

$\beta$ -actina	Reagentes	$\mu$ L/amostra
	Água	6,5
	2x RT Buffer	12,5
	25xRT-PCR <i>Enzyme mix</i>	1
	Primer senso [10 $\mu$ M]	1
	Primer antissenso [10 $\mu$ M]	1
	Sonda [5 $\mu$ M]	1
	RNA	2
	<b>Total por reação</b>	<b>25<math>\mu</math>L</b>

Quadro 6 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da PCR em tempo real *one-step* no aparelho de PCR em tempo real 7500 Real-Time PCR.

Etapas do programa	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	1 ciclo	50°C	30 minutos
Inativação da transcriptase reversa/ Desnaturação inicial	1 ciclo	95°C	10 minutos
Desnaturação Anelamento/Extensão	45 ciclos	95°C 56°C	15 segundos 30 segundos

Quadro 7 - Classificação do Cq (ciclos de quantificação) das amostras submetidas ao ensaio LN34 Pan-Lyssavirus *One-Step* RT-qPCR

Resultado	LN34 Cq	$\beta$ -actina Cq	Interpretação
Negativo	Não detectado	$\leq 33$ e $> 0$	Ausência de RNA de RABV
Positivo	$< 35$	Qualquer	Presença de RNA de RABV
Inconclusivo	35-45	Qualquer	Possível contaminação, inibição, baixa carga viral ou quantidade insuficiente de amostra
Inconclusivo	Não detectado	33-45 ou 0	Possível inibição ou quantidade insuficiente de amostra

Fonte: Rupprecht; Fooks; Abela-Ridder (2019)

### 1.4.2.5 RT-PCR convencional

Com o intuito de confirmar o diagnóstico em amostras com resultados divergentes entre as diferentes técnicas, o RT-PCR convencional e o sequenciamento nucleotídeo foram aplicados nas amostras que foram discordantes (negativas na IFD mas positivas no ensaio do LN34).

### 1.4.2.6 Síntese de DNA complementar (cDNA) pela Transcrição Reversa (RT)

Primeiramente, como a raiva é um vírus do tipo RNA, é necessário que se faça a transcrição reversa com o intuito de gerar o cDNA. Para isto, foi utilizado o kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme o protocolo do fabricante.

A transcrição reversa (síntese de cDNA) foi realizada a 42°C/60' no Termociclador (XP Cyclor, Bioer Technology) em um mix contendo 8µL de 5x First Strand Buffer, 6µL de dNTP na concentração de 10mM (2,5mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4µL de ditiotreitól (DTT) na concentração de 0,1M, 5µL de cada primer (senso Início e antissenso P784), ambos os primers na concentração de 10µM (Quadro 8), 5µL de RNA extraído, 1µL de *SuperSript™II RT* (2.000U/µL) e água ultrapura q.s.p. para uma reação final de 47µL (Quadro 9). Uma vez que a reação foi concluída, as amostras de cDNA foram armazenadas no freezer -20°C até serem utilizadas na técnica de PCR.

Quadro 8 - Sequência de primers utilizados nas reações de transcrição reversa e de PCR convencional

Primers	Sentido	Sequência (5' – 3')	Região*	Referência
Início	senso	ACGCTTAACAACAARATCARAG	1-22	CAMPOS et al., 2011
P784	antissenso	CCTCAAAGTTCTTGTGGAAGA	784-805	SOARES et al., 2002

O nucleotídeo degenerado está codificado de acordo com as normas da IUPAC (R: A ou G).  
\*A região de hibridização dos primers é em relação ao genoma completo do vírus fixo PV (número de acesso no GenBank: M13215.1), que contempla a região leader 3' e parte inicial do gene que codifica a nucleoproteína.

Quadro 9 - Preparação do Mix da Transcrição Reversa do PCR convencional

Reagentes	$\mu\text{L}/\text{amostra}$
5X First-Strand Buffer	8
dNTP 10 mM	6
Ditiotreitol (DTT) 0,1 M	4
SuperSript™II RT (2.000U/ $\mu\text{L}$ )	1
Primer senso Início 10 $\mu\text{M}$	5
Primer antissenso P784 10 $\mu\text{M}$	5
Água	13
RNA	5
<b>Total por reação</b>	<b>47<math>\mu\text{L}</math></b>

#### 1.4.2.7 PCR convencional

Para a reação da PCR convencional, foi utilizado o kit *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen® Life Technologies)* conforme preconizado pelo fabricante.

O PCR convencional foi submetido ao ciclo descrito no Quadro 10 e realizado no Termociclador (*XP Cycler, Bioer Technology*) em um mix contendo 4 $\mu\text{L}$  10X PCR Buffer -Mg, 8 $\mu\text{L}$  dNTP na concentração de 1,25mM (2,0mM de cada: dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5 $\mu\text{L}$  de cada primer (senso Início e antissenso P784), ambos os primers na concentração 10 $\mu\text{M}$  (Quadro 8), 2,5 $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub>, 0,5 $\mu\text{L}$  Platinum Taq DNA Polymerase, 5  $\mu\text{L}$  de cDNA e água ultra pura q.s.p. para uma reação final de 50 $\mu\text{L}$  (Quadro 11). Uma vez que a reação foi concluída, as amostras de PCR foram armazenadas no freezer -20°C até serem utilizadas na eletroforese.

Quadro 10 - Condições de tempo e temperatura, e número de ciclos para a amplificação pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

Etapas do programa	Ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1 ciclo	94°C	5 minutos
Desnaturação	35 ciclos	94°C	45 segundos
Hibridização	35 ciclos	55°C	45 segundos
Extensão	35 ciclos	72°C	2 minutos
Extensão final	1 ciclo	72°C	10 minutos

Quadro 11 - Preparação do Mix do PCR convencional

Reagentes	μL/amostra
10X PCR Buffer -Mg	4
dNTP 1,25mM	8
Primer senso Início 10 μM	2,5
Primer antissenso P784 10 μM	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
Platinum Taq DNA Polymerase	0,5
Água	24
cDNA	5
<b>Total por reação</b>	<b>50μL</b>

#### 1.4.2.8 Eletroforese em gel de agarose

Com o intuito de analisar o resultado da RT-PCR, foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,45mg/mL), sob o tampão de corrida TBE 1x, na cuba horizontal de eletroforese *Loccus LCH* – 13x15 (Loccus Biotecnologia®). A mistura de 4 μL do produto de PCR (item 1.4.2.7) com 1 μL de *BlueJuice™ Gel Loading Buffer 10x* (Invitrogen® Life Technologies) foi introduzida nas cavidades (poços) do gel de agarose.

Em seguida, a cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte de energia (LPS 300V – Loccus Biotecnologia®) de 200V, 240 mA e 70W durante um período de 40 minutos. Concluída a corrida eletroforética, um transiluminador com luz UV (*UVP Benchtop UV Transilluminator*) foi utilizado para revelar o marcador de tamanho padrão em pares de base 100 bp *DNA Ladder (Invitrogen® Life Technologies)* e as bandas de cada amostra. Devido ao conjunto de primers utilizado nas reações (senso Início e antissenso P784), as bandas apresentadas possuem, aproximadamente, 805 pares de base de tamanho.

### **1.4.2.9 Sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger**

#### **1.4.2.9.1 Purificação do produto de PCR**

A purificação do produto de PCR após a corrida eletroforética (item 1.4.2.8) foi realizada com o kit *GFX PCR DNA gel band purification* (GE Healthcare Bio-Sciences) seguindo as diretrizes do fabricante. Uma vez purificadas, as amostras foram armazenadas no freezer -20°C até serem usadas.

#### **1.4.2.9.2 Sequenciamento nucleotídico – etapa enzimática**

Com a finalidade de sequenciar o produto do PCR purificado e posteriormente identificá-lo geneticamente, o sequenciamento nucleotídico pelo método Sanger foi realizado segundo o método enzimático de terminação em cadeia com *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

Foram feitas reações independentes para o primer senso Início e para o primer antissenso P784 para cada amostra. O mix foi formado por *BigDye v3.1*, primer senso (Início) ou antissenso (P784) a 3,2 µM e pelo produto do PCR purificado (Quadro 12). O controle da reação do sequenciamento faz-se com a amostra pGEM. O mix do pGEM foi composto pelo *BigDye v3.1*, *primer* a 0,8 µM (*primer* específico do pGEM)



e água DNA/RNase free. Ambas as reações (amostra e controle) totalizaram 10 $\mu$ L (Quadros 12 e 13) e foram submetidas ao ciclo descrito no Quadro 14.

Quadro 12 - Mix da reação de sequenciamento das amostras

Reagentes	$\mu$ L/amostra
BigDye	4 $\mu$ L
Primer (Senso ou Antissenso)	1 $\mu$ L
cDNA purificado	5 $\mu$ L
<b>Total da reação</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Quadro 13 - Mix do controle da reação de sequenciamento pGEM

Reagentes	
BigDye	4 $\mu$ L
Primer 0,8 uM	4 $\mu$ L
pGEM	1 $\mu$ L
Água DNA/RNase free	1 $\mu$ L
<b>Total da reação</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Quadro 14 - Condições de tempo e temperatura, e número de ciclos para a amplificação pelo método da reação de sequenciamento.

Etapas do programa	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1 ciclo	96°C	1 minuto
Desnaturação	30 ciclos	96°C	10 segundos
Anelamento	30 ciclos	50°C	5 segundos
Extensão	30 ciclos	60°C	4 minutos
Conservação	1 ciclo	10°C	$\infty$

#### 1.4.2.9.3 Sequenciamento nucleotídico – eletroforese capilar em gel

Após a reação de sequenciamento, foi realizada purificação das amostras utilizando *Sephadex™ G-50 fine* (GE Healthcare Bio-Sciences) em placas com filtro Multiscreen HV com 96 orifícios. Posteriormente, as sequências de DNA foram determinadas pelo sequenciador automático *SeqStudio Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante.

#### 1.4.2.10 RT-qPCR AgV3

Para caracterização de amostras clínicas de herbívoros, morcego hematófago *Desmodus rotundus* e morcego frugívoro *Artibeus lituratus*, compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3), foi utilizado o ensaio de PCR em tempo real (qPCR) descrito por Scheffer (2011).

Esse ensaio foi realizado utilizando placa de 96 orifícios *MicroAmp® Optical 96 well Reaction Plate*, e em cada orifício foram distribuídos 12,5µL de 2X *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1,25µL do *Custom Taqman® Gene Expression Assay* 20X, contendo os primers senso K1 e antissenso K2, e a sonda de hidrólise KP (Quadro 15), 8,75µL de água livre de nucleases, e 2,5µL de cDNA de amostra (item 1.4.2.6), totalizando um volume de 25µL (Quadro 16). Cada amostra foi feita em duplicata e todas as reações contavam com um controle positivo (amostra sabidamente positiva e anteriormente tipificada como AgV3) e um controle negativo (água ultrapura).

A placa de 96 orifícios foi colocada no aparelho de PCR em tempo real 7500 Real-Time PCR, e submetida aos ciclos de temperaturas descritos no Quadro 17. Os resultados foram analisados no 7500 Software Applied Biosystems™, e as amostras que apresentaram ciclo de quantificação (Cq) menor que 35, foram consideradas positivas. Foi considerado inconclusivo, as amostras com Cq entre 35 e 40. E as amostras eram consideradas negativas quando o Cq era maior que 40.

Quadro 15 - Sequência de primers e sonda utilizados nos ensaios de qPCR para caracterização de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV

<b>Primers</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Região*</b>
Primer K1	Senso	GAGACAGCCCCCTTTGCA	590-607
Primer K2	Antissenso	GCCAGGAATCTGAAATTTGGTATGG	666-690
Sonda KP	-	(FAM) ACGACCCACAAAATGT (MGB)	635-650

A sonda KP é marcada com *reporter* FAM na porção 5', e *quencher* MGB na porção 3'.  
 \*A região de hibridização dos *primers* e da sonda é em relação ao genoma completo do vírus fixo PV (número de acesso no GenBank: M13215.1).

Quadro 16 - Mix da reação de PCR em tempo real (qPCR) para caracterização de amostras compatíveis com a variante antigênica 3 (AgV3) do RABV

<b>Reagentes</b>	<b>µL/amostra</b>
2X <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Universal PCR Master Mix</i>	12,5 µL
<i>Custom Taqman</i> <sup>®</sup> <i>Gene Expression Assay 20X</i>	1,25 µL
Água ultrapura	8,75µL
cDNA	2,5µL
<b>Total da reação</b>	<b>25 µL</b>

Quadro 17 - Condições de temperatura e tempo para cada ciclo da qPCR no aparelho de PCR em tempo real 7500 Real-Time PCR

<b>Etapas do programa</b>	<b>Número de Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Incubação enzima UNG	1 ciclo	50°C	2 minutos
Ativação enzima Amplitaq Gold	1 ciclo	95°C	10 minutos
Desnaturação	45 ciclos	95°C	15 segundos
Hibridização e extensão	45 ciclos	60°C	1 minuto

#### 1.4.2.11 Análise dos resultados

O cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica das provas laboratoriais executadas (IFD, IVCC e RT-qPCR) foi feita a partir da relação entre positividade e negatividade nas amostras de SNC (Anexo A). Para esse propósito, foram empregadas as seguintes fórmulas matemáticas:

$S_{\text{teste}} = P_{\text{teste}} / P_{\text{total}}$ , sendo  $S_{\text{teste}}$  = sensibilidade diagnóstica de determinada prova laboratorial,  $P_{\text{teste}}$  = positividade de determinada prova laboratorial e  $P_{\text{total}}$  = positividade total (levando em conta os resultados de todas as provas laboratoriais).

$E_{\text{teste}} = N_{\text{teste}} / N_{\text{total}}$ , sendo  $E_{\text{teste}}$  = especificidade diagnóstica de determinada prova laboratorial,  $N_{\text{teste}}$  = negatividade de determinada prova laboratorial e  $N_{\text{total}}$  = negatividade total (levando em conta os resultados de todas as provas laboratoriais).

Para que a amostra de SNC seja considerada positiva para raiva, a mesma deveria apresentar resultados concordantes em pelo menos duas provas laboratoriais. Na presença de apenas um único resultado positivo, o resultado foi considerado como inconclusivo e na ausência de comprovação da especificidade analítica foi classificado como falso positivo.

Para avaliar a concordância entre os resultados gerados das diferentes provas diagnósticas, calculou-se o índice de Kappa ( $\kappa$ ) de concordância (intervalo de confiança 95%), usando-se o programa estatístico *GraphPad Prism version 7* conforme método descrito por Landis e Koch (1977).

$K < 0$ : não existe concordância

$K$  entre 0 e 0,20: concordância mínima

$K$  entre 0,21 e 0,40: concordância razoável

$K$  entre 0,41 e 0,60: concordância moderada

$K$  entre 0,61 e 0,80: concordância substancial

$K$  entre 0,81 e 1,00: concordância quase perfeita

## 1.5 RESULTADOS

Comparando-se os resultados entre a IFD e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, o grau de concordância entre esses dois testes, avaliados pelo índice de kappa, foi de  $0,935 \pm 0,019$  (concordância quase perfeita). Apenas 11 amostras (3,3%) apresentaram resultados discordantes entre as duas técnicas (Tabela 3 e Quadro 18).

A IFD apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 96,5% e 100%, respectivamente (Tabela 3). Já a RT-qPCR LN34 apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100% e 96,7%, respectivamente, considerando cinco resultados inconclusivos (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre a imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* para detecção do RABV em 332 amostras de SNC

		RT-qPCR LN34			Total
		Pos	Neg	Inc	
IFD	Pos	170	0	0	170
	Neg	6	151	5	162
		176	151	5	332

Os resultados individuais das amostras podem ser observados no Anexo A. No entanto, é importante ressaltar que o padrão ouro de diagnóstico post-mortem da raiva (IFD) detectou 170 amostras clínicas positivas e 162 negativas. Dessas 162 amostras negativas pela IFD, o ensaio do RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* detectou 11 amostras como positivas conforme mostra o Quadro 18.

Dessas 11 amostras, seis foram confirmadas como positivas, sendo que quatro apresentaram-se positivas na RT-PCR convencional e sequenciamento nucleotídico (190108002096, 190108002824, 200108000104 e 200108000131) e duas amostras de herbívoros apresentaram resultados positivos na RT-qPCR AgV3 (200108001746 e 200108002706). Nas demais cinco amostras (negativas na IFD e positivas na RT-qPCR LN34) não foi possível ter resultados confirmatórios (no RT-PCR convencional e sequenciamento nucleotídico) e provisoriamente foram classificados como inconclusivos: 190108002445, 192410000614, 190108003312, 200108001825 e 200108001993 (Quadro 18).

As amostras de capivara (190108002445) e cão (192410000614), apesar de apresentarem resultados positivos nas provas de RT-qPCR LN34 e RT-qPCR AgV3, foram consideradas inconclusivas, pois a RT-qPCR AgV3 foi padronizada apenas na detecção de RABV em amostras clínicas de herbívoros domésticos, morcego hematófago *Desmodus rotundus* e morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (CENTOAMORE et al., 2020).

Das 11 amostras negativas na IFD, nove (81,8%) apresentavam concentrações virais reduzidas na RT-qPCR LN34, ou seja: duas com carga viral extremamente baixa (valores de Cq  $\geq 31,1$  e  $< 35$ ), três com carga viral baixa (Cq  $\geq 26,1$  e  $< 31$ ) e quatro com carga viral moderada (Cq  $\geq 19,1$  e  $< 26$ ) (Quadro 18).

Quadro 18 - Resultados que apresentaram divergências entre a prova padrão ouro imunofluorescência direta (IFD) e RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	RT-PCR/ Seq	RT-qPCR LN34	RT-qPCR AgV3	Resultado Final
190108002096	Eq	Neg	Neg	Pos	32,8	NR	Pos
190108002445	Capivara	Neg	Neg	NR	27,4	33,1*	Inc
190108002824	Bov	Neg	Neg	Pos	17,5	NR	Pos
190108003312	Eq	Neg	Neg	Neg	31,1	NR	Inc
192410000614	Cão	Neg	Neg	Neg	22	31,1*	Inc
200108000104	Eq	Neg	Neg	Pos	22,7	NR	Pos
200108000131	Eq	Neg	Neg	Pos	26,4	NR	Pos
200108001746	Eq	Neg	NR	Neg	26,4	32,9	Pos
200108001825	Bov	Neg	Inc	Neg	18,8	NR	Inc
200108001993	Eq	Neg	Neg	Neg	20,9	35,1*	Inc
200108002706	Eq	Neg	Neg	NR	23,9	29,4	Pos

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; Seq: sequenciamento nucleotídico; Pos: positivo; Neg: negativo; NR: não realizado; Inc: inconclusivo; Eq.: equino; Bov.: bovino; \*amostras não consideradas positivas pela RT-qPCR AgV3.

Comparando-se os resultados entre o isolamento viral em cultivo celular (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*, o grau de concordância entre esses dois testes, avaliados pelo índice de kappa, foi de  $0,726 \pm 0,037$  (concordância substancial). 41 amostras (13,6%) apresentaram resultados discordantes entre as duas técnicas (Quadro 19).

O IVCC apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 76% e 97,3%, respectivamente (Tabela 4). Já a RT-qPCR apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100% e 96,7%, respectivamente, considerando cinco resultados inconclusivos (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para detecção do RABV em 302 amostras de SNC

		RT-qPCR LN34			Total
		Pos	Neg	Inc	
IVCC	Pos	114	0	0	114
	Neg	33	144	4	181
	Inc	3	3	1	7
		150	147	5	302

Foram 302 amostras submetidas ao IVCC e também ao RT-qPCR LN34. Desse total, 114 amostras foram positivas no IVCC e na RT-qPCR LN34, enquanto 144 amostras foram negativas tanto no IVCC quanto na RT-qPCR. Além disso, sete amostras que demonstraram resultados inconclusivos no IVCC, sendo três positivas, três negativas e uma inconclusiva na RT-qPCR. Contudo, 37 amostras foram negativas no IVCC, mas positivas na RT-qPCR LN34 (Quadro 19).

Dessas 37 amostras IVCC negativas, foram confirmadas a positividade em 33. Nas quatro demais (IVCC negativas e RT-qPCR LN34 positivas), elas foram consideradas inconclusivas (Quadro 19).

A maioria das amostras IVCC negativas e RT-qPCR LN34 positivas (34/37, 91,9%) foram provenientes de amostras de herbívoros (Quadro 19).

Das 37 amostras negativas na IVCC, apenas 13 (35,1%) apresentavam concentrações virais reduzidas na RT-qPCR LN34, ou seja: duas com carga viral extremamente baixa (valores de  $Cq \geq 31,1$  e  $< 35$ ), três com carga viral baixa ( $Cq \geq 26,1$  e  $< 31$ ) e oito com carga viral moderada ( $Cq \geq 19,1$  e  $< 26$ ) (Quadro 19).

Quadro 19 - Resultados que apresentaram divergências entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus

Amostra	Identificação	IFD	IVCC	RT-qPCR LN34	Resultado
181733000097	Morcego	Pos	Inc	22,7	Pos
190108000288	Morcego	Pos	Neg	22,5	Pos
190108000311	Bovino	Pos	Neg	21,5	Pos
190108001512	Equino	Pos	Neg	21,4	Pos
190108001543	Bovino	Pos	Neg	10,7	Pos
190108001868	Bovino	Pos	Neg	13,3	Pos
190108001998	Bovino	Pos	Neg	12,6	Pos
190108002012	Equino	Pos	Neg	29,7	Pos
190108002013	Bovino	Pos	Neg	15,9	Pos
190108002069	Ovino	Pos	Neg	14,5	Pos
190108002096	Equino	Neg	Neg	32,8	Pos*
190108002181	Bovino	Pos	Inc	10,7	Pos
190108002226	Equino	Pos	Neg	12,6	Pos
190108002260	Ovino	Pos	Neg	12,6	Pos
190108002291	Bovino	Pos	Neg	17,6	Pos
190108002296	Bovino	Pos	Neg	22,7	Pos
190108002387	Bovino	Pos	Neg	14,5	Pos
190108002445	Capivara	Neg	Neg	27,4	Inc
190108002511	Bovino	Pos	Neg	11,1	Pos
190108002512	Bovino	Pos	Neg	9,5	Pos
190108002514	Equino	Pos	Neg	16,9	Pos
190108002549	Bovino	Pos	Neg	16,2	Pos
190108002739	Ovino	Pos	Neg	9,1	Pos
190108002824	Bovino	Neg	Neg	17,5	Pos*
190108002967	Equino	Pos	Neg	12,2	Pos
190108003312	Equino	Neg	Neg	31,1	Inc
190108003477	Bovino	Pos	Neg	13	Pos
190108003525	Bovino	Pos	Neg	11,2	Pos
190108003537	Equino	Pos	Neg	20	Pos
190108003834	Bovino	Pos	Inc	14,3	Pos
190108004491	Gato	Pos	Neg	12,4	Pos
190108004730	Bovino	Pos	Neg	11,6	Pos
190108004732	Morcego	Pos	Neg	3,5	Pos
190108005206	Equino	Pos	Neg	15,5	Pos
192410000614	Cão	Neg	Neg	22	Inc
192410000636	Morcego	Pos	Neg	3,8	Pos
200108000104	Equino	Neg	Neg	22,7	Pos*
200108000131	Equino	Neg	Neg	26,4	Pos*
200108001825	Bovino	Neg	Inc	18,8	Inc
200108001993	Equino	Neg	Neg	20,9	Inc
200108002706	Equino	Neg	Neg	23,9	Pos <sup>#</sup>

\*RT-PCR/sequenciamento nucleotídico positivo; <sup>#</sup>RT-qPCR AgV3; Pos: positivo; Neg: negativo; Inc: inconclusivo



## 1.6 DISCUSSÃO

Recentes estudos com resultados promissores sugerem a utilização da prova de RT-qPCR One-Step LN34 Pan-*Lyssavirus* como uma técnica de diagnóstico da raiva confirmatória à IFD (GIGANTE et al., 2018; WADHWA et al., 2017).

Na avaliação dos resultados, similar à investigação relatada por Gigante et al. (2018), observou-se concordância quase perfeita entre os resultados obtidos entre a prova padrão-ouro e a RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus*. Todas as 170 amostras positivas pela IFD foram detectadas pelo ensaio de RT-qPCR. Adicionalmente, a RT-qPCR demonstrou sensibilidade superior em comparação ao teste padrão-ouro IFD, como o estudo de Gigante et al. (2018). Mas apesar disso, provas moleculares são atualmente recomendadas apenas como testes confirmatórios à IFD e não são indicadas como provas primárias (DETTINGER et al., 2021).

Foi também demonstrado que a maioria das amostras negativas pela IFD e positivas na RT-qPCR LN34 apresentavam carga viral reduzida. Este dado corrobora a elevada sensibilidade da prova padrão ouro IFD na maioria dos casos de raiva, indicando ausência de detecção em situações de distribuição antigênica dispersa (CENTOAMORE et al., 2020). Valores similares de sensibilidade da IFD foram encontrados por diversos autores (GERMANO et al., 1977; PEIXOTO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2022). Rodrigues et al. (2022) ao analisarem resultados de 6.514 amostras de diferentes espécies animais provenientes do serviço de vigilância da raiva do Instituto Pasteur (IP), no período de 2008 a 2016, observaram sensibilidade de 93,58% na IFD. Germano et al. (1977), em estudo realizado no IP durante o período de janeiro de 1974 a abril de 1976, observaram sensibilidade na IFD de 95,15% em 2.242 amostras de cães utilizadas no diagnóstico laboratorial da raiva. Já Peixoto et al. (2000), no intervalo de 1981 a 1994, detectaram sensibilidade diagnóstica de 94,1% na IFD em 1.094 amostras de bovinos processadas no Instituto Biológico para diagnóstico laboratorial de raiva.

Nas seis amostras negativas na IFD e comprovadamente positivas por pelo menos duas técnicas diagnósticas, todas eram oriundas de herbívoros, sendo 83,3% animais da espécie equina. De modo semelhante, diversos autores relataram também menor detecção pela IFD no diagnóstico da raiva nessa espécie, comprovando assim a importância da adoção de testes confirmatórios (BASSUINO et al., 2016; PEIXOTO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2022; SOUZA, 2019).

As cinco amostras, classificadas como inconclusivas (negativas na IFD e positivas na RT-qPCR LN34), necessitam confirmação do resultado e não foram detectadas como positivas na RT-PCR e sequenciamento, provavelmente devido a carga viral reduzida ou por inespecificidade da reação.

A sensibilidade diagnóstica do IVCC é semelhante ao observado por Rodrigues et al. (2022). Ao analisarem os resultados de 6.514 amostras provenientes do diagnóstico laboratorial da raiva do IP, no período de 2008 a 2016, esses autores observaram sensibilidade de 70,42% no IVCC.

Provavelmente essa menor sensibilidade do IVCC poderia ser decorrente de alguns fatores, tais como baixa carga viral ou citotoxicidade, em particular em amostras de equinos positivas para raiva (CENTOAMORE et al., 2016; SOUZA, 2019).

A hipótese da baixa carga viral foi confirmada pelos valores de Cq obtidos na RT-qPCR LN34 em apenas 13 amostras negativas no IVCC. No entanto, apesar das amostras utilizadas nas técnicas de IVCC e RT-qPCR de serem provenientes dos mesmos animais, foram realizadas alíquotas do “pool” das amostras distintas em momentos diferentes para essas duas provas, não sendo assim réplicas exatas.

Como o IVCC no IP é realizado a partir do “pool” das diferentes estruturas de tecido nervoso, nas situações de baixa carga viral (onde a distribuição do RABV é esparsa e não uniforme), poderia ocorrer “diluição” ao adicionar estruturas negativas (sem vírus) junto com aquelas “fracamente positivas”, resultando assim em um “viés metodológico” (SOUZA, 2019). Para conseguir um número adequado de partículas virais no IVCC, suficientes para o isolamento, algumas vezes faz-se necessário efetuar múltiplas passagens, o que não é realizado na rotina diagnóstica do IP (CENTOAMORE et al., 2016).

Além disso, as amostras de SNC de herbívoros domésticos no Brasil, devido as condições impróprias de acondicionamento e armazenamento, podem chegar no laboratório em estado de decomposição (autólise). Nesse estado, citotoxicidade deve ocorrer, fato que pode contribuir na diminuição da detecção viral, com maior possibilidade de resultados negativos ou inconclusivos (SOUZA, 2019).

## 1.7 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o ensaio RT-qPCR Pan-*Lyssavirus* apresenta potencial de ser utilizado como prova confirmatória à IFD, sendo eficaz na detecção do RABV em amostras procedentes de diferentes espécies animais, em casos com variantes ou linhagens virais distintas ou mesmo em diferentes concentrações virais.

## 1.8 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. B. et al. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v. 1, 2008.
- BASSUINO, D. M. et al. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 4, p. 455–460, 1 jul. 2016.
- BINGHAM, J.; VAN DER MERWE, M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. **Journal of Virological Methods**, v. 101, n. 1–2, p. 85–94, mar. 2002.
- CAMPOS, A. C. DE A. et al. **One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome** *Journal of Virological Methods* Elsevier B.V., , 2011.
- CARRIERI, M. L. et al. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n. 1–2, p. 1–9, dez. 2006.
- CASTILHO, J. G. et al. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A). **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 4, n. 47, p. 12–18, nov. 2007.
- CENTOAMORE, N. H. F. et al. Análise crítica do desempenho do isolamento viral em células como método substitutivo ao isolamento viral em camundongos no diagnóstico da raiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório, São Paulo**, p. 45–81, 2016.
- CENTOAMORE, N. H. F. **Estudo da neuroinvasividade do vírus da raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 16 ago. 2017.

CENTOAMORE, N. H. F. et al. Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 283, 1 set. 2020.

CHIERATO, M. E. R. **Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a detecção do vírus da raiva no Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 14 jun. 2021.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). . **Laboratory techniques in rabies**. [s.l.] World Health Organization, 1996. p. 88–93.

DETTINGER, L. et al. Potential Early Rabies Infection Detected in Two Raccoon Cases by LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR Assay in Pennsylvania Running Title: Early Rabies Infection Detected by LN34 RT-PCR 4 5. 2021.

GERMANO, P. M. L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 1, p. 133, 15 mar. 1977.

GIGANTE, C. M. et al. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for postmortem rabies diagnostics. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 1 maio 2018.

HAMPSON, K. et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003709, abr. 2015.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. E. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 101–109, jun. 2002.

KUZMIN, I. V. Virus Isolation in Animals. In: RUPPRECHT, C.; NAGARAJAN, T. (Eds.). . **Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2**. [s.l.] Elsevier, 2015. v. 2p. 13–23.

LA ROSA, I. et al. **Rabies variants circulating in Argentina isolated in neuroblastoma cells**. XXIX Rabies in the Americas. **Anais...Buenos Aires: XXIX Rabies in the Americas**, 2018.

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

LEPINE, P.; ATANASIU, P. Histopathological diagnosis. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). . **Laboratory Techniques in Rabies**. 4. ed. [s.l.] World Health Organization, 1996. p. 66–79.

MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). . **Laboratory techniques in rabies**. [s.l.: s.n.]. p. 9–27.

NASRAUI, A. C. R. **Estudo Comparativo Entre as Técnicas de Imunofluorescência Direta, Isolamento Viral em Camundongos e Isolamento Viral em Cultivo Celular Utilizadas no Diagnóstico da Raiva**. São Paulo:

Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2020.

PEIXOTO, Z. M. P. et al. Rabies Laboratory Diagnosis: Peculiar Features of Samples from Equine Origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 72–75, 6 abr. 2000.

RODRIGUES, A. C. et al. A comparative study of direct fluorescent antibody, mouse inoculation, and tissue culture infection testing for rabies diagnoses. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 114426, fev. 2022.

RUDD, R. J.; TRIMARCHI, C. V. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2522–2528, nov. 1989.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. [s.l.] World Health Organization, 2018. v. 1

SCHEFFER, K. C. **Detecção do vírus da raiva em órgãos de morcegos do gênero *Artibeus* (Leach, 1821) por meio de RT-PCR, Hemi-Nested RT-PCR e Real Time RT-PCR**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 30 ago. 2011.

SOARES, R. M. et al. **A Heminested Polymerase Chain Reaction for the Detection of Brazilian Rabies Isolates from Vampire Bats and Herbivores** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. [s.l.: s.n.].

SOUZA, T. DE C. P. DE. **Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 15 out. 2019.

SOUZA, T. C. P. et al. **Evaluation of sample concentrations in the accuracy of the rabies virus isolation in N2A cell culture**. The 26th annual Rabies in the Americas Conference. **Anais...**Fort Collins: 2015.

STEIN, L. T. et al. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 4, p. 630–636, 2010.

TDR DIAGNOSTIC EVALUATION EXPERT PANEL et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. S12, p. S16–S28, dez. 2010.

TIERKEL, E. S. Laboratory techniques in rabies: rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. **Monograph series. World Health Organization**, n. 23, p. 41–55, 1973.

WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, 12 jan. 2017.

YUNG, P. V. et al. **Diagnóstico e identificação de variantes de vírus rábico em Chile**. XXIX Rabies in the Americas. **Anais...**Buenos Aires: 2018.

## Capítulo 2

**Análise do desempenho do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus *multiplex* para a vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva em amostras animais no Brasil**

## 2.1 RESUMO

Como a raiva é uma doença fatal após a manifestação neurológica, o diagnóstico deve ser acurado e rápido. O teste padrão ouro para diagnosticá-la é a imunofluorescência direta (IFD), mas técnicas moleculares como RT-PCR convencional são utilizadas como teste confirmatório. O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* é uma evolução do RT-PCR convencional e manifestou resultados muito favoráveis. Esse ensaio foi originalmente planejado para amplificar o gene da sequência-alvo das Lyssavíroses (região *leader* e os primeiros 95 nucleotídeos do gene N) e o controle interno  $\beta$ -actina em duas reações separadas, mas concomitantes (*singleplex*). O RT-qPCR *multiplex* possibilita a amplificação simultânea de mais de um gene alvo. Dessa forma, o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus multiplex* viabiliza a amplificação concomitante da região *leader*, os primeiros 95 nucleotídeos do gene N e o controle interno  $\beta$ -actina em uma mesma reação. O objetivo desse trabalho foi de avaliar o desempenho do ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus multiplex* para detecção simultânea do vírus da raiva (região *leader* e gene N) e do controle de amplificação interno  $\beta$ -actina em amostras clínicas de sistema nervoso central de diferentes espécies de animais. De 211 amostras analisadas, somente nove amostras (4,2%) foram discordantes entre a IFD e o RT-qPCR *multiplex*. Outras nove amostras (4,2%) foram discordantes entre o RT-qPCR no formato *singleplex* e no *multiplex*. A IFD e o RT-qPCR *multiplex* apresentaram grau de concordância quase perfeita ( $0,916 \pm 0,027$ ) no índice kappa. O RT-qPCR no formato *singleplex* e no *multiplex* apresentaram grau de concordância quase perfeita ( $0,918 \pm 0,027$ ) no índice kappa. Conclui-se que o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus multiplex* deve ser utilizado com parcimônia como teste confirmatório para o diagnóstico da raiva, visto que em amostras com baixa carga viral existe a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-negativos.

**Palavras-chave:** raiva, RT-qPCR, multiplex, LN34 Pan-*Lyssavirus*, diagnóstico.

## ABSTRACT

Since rabies is a lethal disease after neurological signs present, the diagnosis must be fast and accurate. The gold standard test to diagnosis it is the direct Fluorescent Antibody Test (dFAT), but molecular techniques such as the traditional RT-PCR are used as confirmatory test. The RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* assay is an evolution of the traditional RT-PCR and displayed encouraging results. This assay was originally designed to amplify the *Lyssavirus*' gene target (leader region and the first 95 nucleotides of N gene) and the intern control  $\beta$ -actin in two distinct reactions, but simultaneously (singleplex). The RT-qPCR multiplex enables the amplification of several targets at the same time. Therefore, the RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* multiplex amplifies the leader region, the first 95 nucleotides of N gene and the intern control  $\beta$ -actin in the same reaction concurrently. This study aimed to analyze the RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* multiplex performance to simultaneously detect the rabies virus (leader region and N gene) and the intern control  $\beta$ -actin in the central nervous system clinic samples from different species. From 211 samples, only nine samples (4.2%) were discordant between the dFAT and RT-qPCR multiplex. Other nine samples (4.2%) had their results diverged between the RT-qPCR singleplex and multiplex. The dFAT and RT-qPCR multiplex had an almost perfect agreement ( $0.916 \pm 0.027$ ) in the Kappa test. The RT-qPCR multiplex and the singleplex had an almost perfect agreement ( $0.918 \pm 0.027$ ) in the Kappa test. In conclusion, the RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* multiplex may be carefully used as a confirmatory test to diagnose rabies, since low viral load samples have a risk of false-negative result.

**Keywords:** rabies, RT-qPCR, multiplex, LN34 Pan-*Lyssavirus*, diagnosis.



## 2.2 INTRODUÇÃO

Como a raiva é uma enfermidade de evolução indubitavelmente fatal em mamíferos (incluindo os seres humanos), uma vez que as manifestações neurológicas aparecem, os testes diagnósticos devem ser realizados rapidamente e devem apresentar alto desempenho em relação a sensibilidade e especificidade diagnósticas (WADHWA et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Os métodos moleculares como a RT-PCR convencional e sequenciamento nucleotídico têm sido preconizados no Brasil para o diagnóstico *antemortem* da raiva e monitoramento da eficácia terapêutica (protocolo de Recife) em humanos a partir de amostras de saliva, biópsia da pele da região da nuca (folículo piloso) e líquido cefalorraquidiano (BRASIL, 2011). Além disso, essas técnicas têm sido utilizadas como testes confirmatórios à IFD nas situações de resultados inconclusivos, amostras degradadas e para caracterização genética das linhagens virais em espécimes de SNC provenientes de animais e humanos. Sabe-se que a RT-PCR convencional, especialmente RT-PCR *hemi-nested*, é propensa a amplificação inespecífica (“bandas espúrias”) ou mesmo contaminação cruzada, podendo ocasionar resultados falso-positivos. Uma etapa adicional de sequenciamento do amplicon, que é demorada e trabalhosa, é necessária para descartar esses casos (HEATON et al., 1997; WADHWA et al., 2017).

O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* demonstrou resultados promissores no diagnóstico da raiva, com alta sensibilidade e especificidade (GIGANTE et al., 2018; MINOZZO et al., 2022; WADHWA et al., 2017). Essa técnica é considerada do tipo “tubo fechado”, na qual não requer etapa adicional de eletroforese para revelação dos resultados, o que reduz a chance de resultados falso-positivos por contaminação cruzada, além de ser mais rápida e menos trabalhosa. Em laboratórios de rotina diagnóstica, o uso de tal teste molecular ainda pode ser limitado pelo custo e, às vezes, pela disponibilidade da quantidade adequada de amostra para o teste.

Essa metodologia apresenta sonda do tipo ácido nucleico bloqueado (LNA, do inglês *locked nucleic acid*), que possui a propriedade de intensificar a estabilidade térmica na ligação da sonda com a sequência-alvo, através do aumento da temperatura de *melting*, resultando em um incremento na discriminação de polimorfismos em uma única base nucleotídica. Devido a essa propriedade, essa

sonda tipo LNA tem demonstrado ter sensibilidade e especificidade analíticas superiores as outras sondas de hidrólise Taqman<sup>®</sup> previamente utilizadas em estudos anteriores de RT-qPCR para diagnóstico da raiva e outros *Lyssavirus* (RODRIGUES et al., 2022; WADHWA et al., 2017).

A sequência-alvo no ensaio LN34 amplifica uma região de 165 nucleotídeos, considerada a mais conservada entre as diferentes espécies de *Lyssavirus*, incluindo a sequência *leader* de 58 nucleotídeos e os primeiros 95 nucleotídeos do gene N (WADHWA et al., 2017). Diferentemente dos estudos prévios de RT-qPCR, os quais requeriam um número elevado de sondas de hidrólise Taqman<sup>®</sup>, o ensaio LN34 demonstrou ser possível um teste de diagnóstico universal utilizando poucas sondas do tipo LNA para detecção das diversas espécies de *Lyssavirus* e variantes do RABV (BLACK et al., 2002; DEUBELBEISS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2022; WADHWA et al., 2017; WAKELEY et al., 2005).

Problemas potenciais na RT-qPCR incluem falso-negativos que podem ocorrer devido a diversos fatores, tais como: 1) degradação ou em quantidade insuficiente da amostra (por problemas na coleta, transporte, conservação e processamento); 2) presença de inibidores da amplificação (MOLDOVAN; MOLDOVAN, 2020). A incorporação de um controle interno  $\beta$ -actina de amplificação no ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* por Wadhwa et al. (2017) foi uma estratégia eficaz para monitorar a performance de todo o procedimento de diagnóstico (extração, transcrição reversa e amplificação dos ácidos nucleicos) e descartar resultados falso-negativos. Sabe-se que  $\beta$ -actina pertence a classe de genes denominados *housekeeping* (constitutivos) ou endógeno, que são definidos como aqueles necessários na manutenção das funções celulares básicas e são expressos em os todos os tipos celulares (AGIANNIOTAKI et al., 2021; MOLDOVAN; MOLDOVAN, 2020).

O ensaio desenvolvido de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* foi inicialmente desenvolvido por Wadhwa et al. (2017) para ser amplificado de modo simultâneo na mesma corrida de modo *singleplex*: os genes da sequência-alvo (região *leader* e início do gene N) e do controle interno  $\beta$ -actina. Recentemente, Minozzo et al. (2022) adaptaram esse ensaio LN34 de modo multiplex. Esses autores observaram 100% de concordância dos resultados entre a IFD e os ensaios LN34 *multiplex* e *singleplex* em 88 amostras (41 positivas e 47 negativas).

A técnica de RT-qPCR no formato *multiplex* permite a identificação e amplificação de mais de uma sequência-alvo de ácidos nucleicos (dois ou mais loci), de modo simultâneo, pela inclusão adicional de diferentes pares de *primers* (ou iniciadores) e sondas marcados com corantes fluorescentes com espectros distintos na sua porção *reporter* para cada alvo em uma mesma reação (como por exemplo, HEX e FAM). Tal procedimento laboratorial pode diminuir o tempo de liberação dos resultados e reduzir a carga de trabalho para o diagnóstico, por possibilitar o processamento de um maior número de amostras (otimizando o uso do equipamento) e também deve causar redução dos custos do teste, por utilizar menor quantidade de reagentes e materiais (plásticos) em relação a técnica em formato *singleplex* (EDWARDS; GIBBS, 1994; HENEGARIU et al., 1997; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A “multiplexação” requer a apresentação de evidências que demonstrem que o desempenho similar ao demonstrado no formato *singleplex* em relação a sensibilidade, especificidade e limite de detecção. Essa preocupação é de particular importância quando alvos menos frequentes são coamplificados com alvos mais abundantes (BUSTIN et al., 2009). Quando genes constitutivos são utilizados como controle interno da amplificação, um ensaio *multiplex* com limitação na concentração dos primers e da sonda pode ser necessária. Essas condições limitadas de reação evitam o consumo precoce de reagentes (como por exemplo dNTPs) antes que o alvo menos frequente seja amplificado.

## 2.3 OBJETIVOS

O presente estudo teve o objetivo avaliar o desempenho do ensaio de RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex* para detecção simultânea do RABV (região *leader* e gene N) e do controle de amplificação interno  $\beta$ -actina em amostras clínicas de SNC provenientes do serviço de vigilância e diagnóstico laboratorial da raiva do Instituto Pasteur.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Material

Para a avaliação do RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex*, foram utilizadas 211 amostras clínicas de SNC, coletadas durante o período de abril de 2018 a novembro de 2020 e procedentes do serviço de diagnóstico laboratorial da raiva no Instituto Pasteur de São Paulo (Anexo A).

Todas as 211 amostras utilizadas para o estudo, 109 foram negativas e 102 foram positivas no padrão ouro (IFD) (Anexo A), também foram testadas de modo concomitante no estudo do ensaio LN34 no modo *singleplex* (item 1.4).

### 2.4.2 Métodos

#### 2.4.2.1 Extração de RNA Total utilizando kit de extração *RNeasy Lipid Tissue Mini*

Todas as 211 amostras de SNC foram extraídas com o kit de extração de RNA *RNeasy Lipid Tissue Mini* (Qiagen) por colunas com membranas de sílica, conforme prescrito pelo fabricante. Após extraído, o RNA foi imediatamente armazenado em freezer a -80°C até ser utilizado. Aproximadamente, 30 mg de encéfalo foram utilizados para a extração de cada amostra.

#### 2.4.2.2 One-Step RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *singleplex*

Após extração do material genético conforme o item 2.4.2.1, o reagente *AgPath-ID one-step RT-PCR kit* (ThermoFisher Scientific) e o conjunto de primers e sonda do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus One Step* (Quadro 2) foram usados para detectar o RNA do RABV. Ademais, um conjunto de primers e sonda de hidrólise (Quadro 3) também foram utilizados de modo concomitante no *singleplex* para detectar o gene da  $\beta$ -actina, que funciona com um controle endógeno da reação.

Todos os reagentes e reações realizados seguiram a metodologia preconizada por Wadhwa et al. (2017).

#### **2.4.2.3 One-Step RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato *multiplex***

Foi realizado o ensaio *One-Step* RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus do modo *multiplex* utilizando-se o reagente *AgPath-ID one-step RT-PCR kit* (ThermoFisher Scientific) com *primers*/sonda descritos para detecção da região *leader* e do início do gene codificador da nucleoproteína (Quadro 2) e do gene codificador da  $\beta$ -actina (Quadro 3) de acordo com descrito por Wadhwa et al. (2017) (item 1.4.2.4).

Por ser uma reação de formato *multiplex*, os *primers* e sondas LN34 Pan-Lyssavirus e  $\beta$ -actina (Quadros 2 e 3) foram utilizados de modo simultâneo em uma mesma reação conforme descrito no Quadro 20. Modificações do protocolo originalmente descrito por Wadhwa et al. (2017) foram realizadas, como ajuste nas concentrações dos *primers* e sonda para o gene codificante da  $\beta$ -actina.

O aparelho usado para a efetuar a reação de *One Step* RT-qPCR (7500 Real-Time PCR) foi submetido ao ciclo descrito no Quadro 6. As amostras foram analisadas pelo *7500 Software Applied Biosystem™* e a classificação do Cq foi semelhante ao descrito no formato *singleplex* (Quadro 7).

Quadro 20 - Preparação do Mix para o *One-Step* RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex*

Reagentes	μL/amostra
Água	5
2X RT Buffer	12,5
25X RT-PCR enzyme mix	1
LN34 Primer senso 1 [10 μM]	0,5
LN34 Primer senso 2 [10 μM]	0,5
LN34 Primer antissenso [10 μM]	1
LN34 Sonda [5 μM]	1
β-actina Primer senso [10 μM]	0,5
β-actina Primer antissenso [10 μM]	0,5
β-actina Sonda [5 μM]	0,5
RNA	2
<b>Total da reação</b>	<b>25</b>

#### 2.4.2.4 Análise dos resultados

A análise de resultados será através de cálculos para a sensibilidade e especificidade diagnóstica e avaliação do índice Kappa ( $\kappa$ ) de concordância conforme foi descrito no item 1.4.2.11.

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Comparação dos resultados entre a técnica de imunofluorescência direta e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *singleplex*

Comparando-se os resultados entre a IFD e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *singleplex*, o grau de concordância entre esses dois testes,

avaliados pelo índice de kappa, foi de  $0,908 \pm 0,028$  (concordância quase perfeita). Apenas 10 amostras (4,7%) apresentaram resultados discordantes entre essas duas técnicas (Tabela 5 e Quadro 21).

Cinco amostras, negativas na técnica de IFD, apresentaram resultados positivos na RT-qPCR LN34 no formato *singleplex*, a saber: 190108002096, 200108000104, 200108000131, 200108001746 e 200108002706. Todas essas amostras eram provenientes de equinos e apresentavam concentrações virais reduzidas na RT-qPCR LN34: uma com carga viral extremamente baixa (valores de  $Cq \geq 31,1$  e  $< 35$ ), duas com carga viral baixa ( $Cq \geq 26,1$  e  $< 31$ ) e duas com carga viral moderada ( $Cq \geq 19,1$  e  $< 26$ ).

Outras cinco amostras negativas na IFD, foram consideradas inconclusivas na RT-qPCR LN34 no formato *singleplex*, pois não houve a confirmação da positividade: uma de capivara (190108002445), duas de equino (190108003312 e 200108001993), uma de cão (192410000614) e uma de bovino (200108001825) (Quadro 21).

A IFD apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 95,3% e 100%, respectivamente. Já a RT-qPCR LN34 no modo *singleplex* apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 100% e 95,2%, respectivamente, considerando cinco resultados inconclusivos (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre a técnica de imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *singleplex* para detecção do RABV em 211 amostras de SNC.

		LN34 singleplex			Total
		Pos	Neg	Inc.	
IFD	Pos	102	0	0	102
	Neg	5	99	5	109
		107	99	5	211

Pos: positivo; Neg: negativo, Inc.: inconclusivo.

### 2.5.2 Comparação dos resultados entre a técnica de imunofluorescência direta e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex*

Comparando-se os resultados entre a IFD e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex*, o grau de concordância entre esses dois testes, avaliados pelo índice de kappa, foi de  $0,916 \pm 0,027$  (concordância quase perfeita).

Apenas 9 amostras (4,2%) apresentaram resultados discordantes entre essas duas técnicas (Tabela 6 e Quadro 21).

A amostra de equino (200108002706) com carga viral baixa ( $Cq \geq 26,1$  e  $< 31$ ), negativa na técnica de IFD, foi positiva na RT-qPCR LN34 no formato *multiplex*.

Quatro amostras negativas na IFD, foram consideradas inconclusivas na RT-qPCR LN34 no formato *multiplex*, pois não houve a confirmação da positividade, a saber: duas de equinos (190108003312 e 200108001993), uma de cão (192410000614) e uma de bovino (200108001825).

Outras quatro amostras, positivas na IFD, foram negativas na RT-qPCR LN34 *multiplex*, a saber: uma de morcego insetívoro *Eptesicus furinalis* (182410000536), uma de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (190108001732) e duas de equinos (190108002012 e 190108002427). Três dessas amostras apresentavam concentrações virais reduzidas na LN34 *singleplex*: uma com carga viral extremamente baixa (valores de  $Cq \geq 31,1$  e  $< 35$ ) e duas com carga viral baixa ( $Cq \geq 26,1$  e  $< 31$ ).

Tabela 6 - Comparação entre a técnica de imunofluorescência direta (IFD) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex* para detecção do RABV em 211 amostras de SNC.

		LN34 multiplex			Total
		Pos	Neg	Inc.	
IFD	Pos	98	4	0	102
	Neg	1	104	4	109
		99	108	4	211

Pos: positivo; Neg: negativo, Inc.: inconclusivo.

### 2.5.3 Comparação dos resultados entre os ensaios RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* nos formatos *singleplex* e *multiplex*

Comparando-se os resultados entre os formatos RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* *singleplex* e *multiplex*, o grau de concordância entre esses dois testes foi de  $0,918 \pm 0,027$  (concordância quase perfeita), segundo o índice kappa (Tabela 7). Nove amostras (4,2%) apresentaram resultados discordantes entre os dois formatos (Tabela 7 e Quadro 21).



Oito amostras, negativas na RT-qPCR LN34 no formato *multiplex*, apresentaram resultados positivos no modo *singleplex*, a saber: uma de morcego insetívoro *Eptesicus furinalis* (182410000536), uma de morcego hematófago *Desmodus rotundus* (190108001732) e seis de equinos (190108002012, 190108002096, 190108002427, 200108000104, 200108000131 e 200108001746). Todas essas amostras apresentavam concentrações virais reduzidas na RT-qPCR LN34 no modo *singleplex*: duas com carga viral extremamente baixa (valores de Cq  $\geq 31,1$  e  $< 35$ ) e seis com carga viral baixa (Cq  $\geq 26,1$  e  $< 31$ ).

A amostra de capivara 190108002445, negativa na RT-qPCR LN34 no formato *multiplex*, foi considerada inconclusiva na LN34 no modo *singleplex*, pois não houve a confirmação da positividade.

O LN34 *multiplex* apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 93,4% e 100%, respectivamente.

Tabela 7 - Comparação entre o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato *singleplex* e no formato *multiplex* para detecção do RABV em 211 amostras de SNC.

		LN34 Singleplex			Total
		Pos	Neg	Inc.	
LN34 Mutiplex	Pos	99	0	0	99
	Neg	8	99	1	108
	Inc.	0	0	4	4
		107	99	5	211

Pos: positivo; Neg: negativo, Inc.: inconclusivo.

#### 2.5.4 Comparação dos resultados entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus no formato *singleplex*

Comparando-se os resultados entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus formato *singleplex*, o grau de concordância entre esses dois testes foi de  $0,679 \pm 0,047$  (concordância substancial), segundo o índice kappa (Tabela 8). 35 amostras (17,4%) apresentaram resultados discordantes entre essas duas técnicas.

O IVCC apresentou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 72% e 100%, respectivamente. Das 100 amostras positivas no ensaio de LN34 *singleplex*, 26 amostras foram negativas e duas inconclusivas na técnica de IVCC. Já das 96 amostras negativas no RT-qPCR LN34 *singleplex*, duas amostras tiveram resultados inconclusivos no IVCC.

Tabela 8 - Comparação entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *singleplex* para detecção do RABV em 201 amostras de SNC.

		LN34 <i>singleplex</i>			Total
		Pos	Neg	Inc.	
IVCC	Pos	72	0	0	72
	Neg	26	94	4	124
	Inc	2	2	1	5
		100	96	5	201

Pos: positivo; Neg: negativo, Inc.: inconclusivo.

### 2.5.5 Comparação dos resultados entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex*

Comparando-se os resultados entre o isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* formato *multiplex*, o grau de concordância entre esses dois testes foi de  $0,691 \pm 0,048$  (concordância substancial), segundo o índice kappa (Tabela 9). 32 amostras (15,9%) apresentaram resultados discordantes entre essas duas técnicas.

Das 93 amostras positivas no ensaio de LN34 *multiplex*, 22 amostras foram negativas e duas inconclusivas na técnica de IVCC. Já das 104 amostras negativas no RT-qPCR LN34 *multiplex*, duas amostras tiveram resultados inconclusivos no IVCC.

Outras três amostras, negativas no LN34 *multiplex*, foram positivas no IVCC, a saber: uma de morcego insetívoro *E. furinalis*. (182410000536), uma de morcego hematófago *D. rotundus* (190108001732) e uma de equino (190108002427). As duas amostras provenientes de quirópteros apresentavam concentrações virais reduzidas na RT-qPCR LN34 no modo *singleplex*: uma com carga viral extremamente baixa (valores de  $Cq \geq 31,1$  e  $< 35$ ) e outra com carga viral baixa ( $Cq \geq 26,1$  e  $< 31$ ).

Tabela 9 - Comparação entre a técnica de isolamento viral em cultivo de células (IVCC) e o ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex* para detecção do RABV em 201 amostras de SNC.

		LN34 multiplex			Total
		Pos	Neg	Inc.	
IVCC	Pos	69	3	0	72
	Neg	22	99	3	124
	Inc	2	2	1	5
		93	104	4	201

Pos: positivo; Neg: negativo, Inc.: inconclusivo.

Quadro 21 - Resultados que apresentaram divergências entre a prova padrão ouro imunofluorescência direta (IFD) e RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* nos formatos *singleplex* e *multiplex*

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	RT-PCR/ Seq	LN34 singleplex	LN34 multiplex	RT-qPCR AgV3	Resultado Final
182410000536	<i>E. furinalis</i>	Pos	Pos	NR	29,5 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
190108001732	<i>D. rotundus</i>	Pos	Pos	NR	31,26 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
190108002012	Equino	Pos	Neg	Pos	29,7 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
190108002096	Equino	Neg	Neg	Pos	32,8 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
190108002427	Equino	Pos	Pos	NR	12,5 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
190108002445	Capivara	Neg	Neg	NR	27,4 (Pos)	0 (Neg)	33,1*	Inc
190108003312	Equino	Neg	Neg	Neg	31,1 (Pos)	27 (Pos)	NR	Inc
192410000614	Cão	Neg	Neg	Neg	22 (Pos)	26,3 (Pos)	31,1*	Inc
200108000104	Equino	Neg	Neg	Pos	22,7 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
200108000131	Equino	Neg	Neg	Pos	26,4 (Pos)	0 (Neg)	NR	Pos
200108001746	Equino	Neg	NR	Neg	26,4 (Pos)	0 (Neg)	32,9	Pos
200108001825	Bovino	Neg	Inc	Neg	18,8 (Pos)	33 (Pos)	NR	Inc
200108001993	Equino	Neg	Neg	Neg	20,9 (Pos)	28,6 (Pos)	35,1*	Inc
200108002706	Equino	Neg	Neg	NR	23,9 (Pos)	26,7 (Pos)	29,4	Pos

IFD: Imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; NR: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo; Q: quiróptero; Eq.: equino; \*Amostras submetidas ao RT-qPCR com alvo na variante 3 (AgV3), e tiveram resultado inconclusivo.

. \*Amostra não considerada positiva pela RT-qPCR AgV3. *E. furinalis*: *Eptesicus furinalis*. *D. rotundus*: *Desmodus rotundus*.

Apesar das amostras de capivara 190108002445 e de cão 192410000614 terem sido detectados na RT-qPCR AgV3, elas não foram consideradas positivas, necessitando de uma confirmação da positividade por outra técnica, como RT-PCR e sequenciamento (Quadro 21). Sabe-se que a técnica de detecção da AgV3 foi

padronizada e validada apenas em amostras clínicas de herbívoros domésticos, morcego hematófago *Desmodus rotundus* e morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (CENTOAMORE et al., 2020).

## 2.6 DISCUSSÃO

Na comparação dos resultados da RT-qPCR LN34 nos formatos *singleplex* e *multiplex*, observa-se pior desempenho neste último modo. Há discordância em oito amostras do total de 211, com diminuição na concentração viral em 87,5% das mesmas, não sendo detectadas na RT-qPCR LN34 formato *multiplex*. Quatro dessas amostras (equinos 190108002096, 200108000104, 200108000131 e 200108001746) foram positivas apenas na RT-qPCR LN34 no formato *singleplex*. Outras três amostras [duas de quirópteros (182410000536 e 190108001732) e uma de equino (190108002012)] foram positivas na IFD e na LN34 *singleplex*.

No sistema *multiplex* é possível que a alta expressão do gene constitutivo da  $\beta$ -actina interfira na performance da detecção do RABV em situações de baixa concentração viral. À medida que ocorre o aumento do número de *primers* e sondas no modo *multiplex*, pode ocorrer diminuição na eficiência de amplificação da sequência-alvo do RABV (região *leader* e nucleoproteína), com amplificação preferencial do gene da  $\beta$ -actina por competição pelos reagentes, aumentando assim a possibilidade de resultado falso-negativo para o LN34 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022; XIAO et al., 2009). Produtos não específicos gerados por interações entre os oligonucleotídeos interferem na amplificação dos alvos reais e podem diminuir a sensibilidade (PORITZ et al., 2011; XIAO et al., 2009).

Sabe-se que na raiva em equinos observa-se com maior frequência a ocorrência de baixa carga viral, situação na qual o RABV dissemina de maneira esparsa no SNC, com predileção da distribuição viral por determinadas estruturas, como aquelas presentes no tronco encefálico (CARRIERI et al., 2006; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018; SOUZA, 2019). Em algumas situações, essas porções de SNC podem estar ausentes, causando um “viés metodológico” por falta de representatividade das amostras. Seis amostras de equinos foram falso-negativas na RT-qPCR LN34 *multiplex*, sugerindo que este formato deveria ser utilizado com parcimônia nesta espécie.

Diferentemente, Minozzo et al. (2022) observaram 100% de concordância entre as técnicas de RT-qPCR LN34 *multiplex* e *singleplex*. No entanto, esses autores realizaram estudo com apenas duas amostras provenientes de equinos que apresentavam carga viral alta a moderada.

Realizou-se, de forma empírica no formato LN34 *multiplex*, uma redução da concentração dos *primers* e sonda correspondentes ao gene da  $\beta$ -actina, fato que aparentemente não interferiu substancialmente na sua detecção. Os valores obtidos de Cq da  $\beta$ -actina foram satisfatórios (Cq<33) em todas as amostras, tanto no formato *singleplex* quanto no *multiplex*, indicando adequação no procedimento de extração e ausência de efeitos inibitórios da amplificação dos ácidos nucleicos (RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2019).

A raiva é uma enfermidade de letalidade quase 100% em animais e seres humanos. Devido a isso, o desenvolvimento de ferramentas rápidas, de baixo custo e com alta sensibilidade e especificidade diagnósticas é algo desejável (FRANKA et al., 2013; HAMPSON et al., 2015; RUPPRECHT; FOOKS; ABELA-RIDDER, 2018). No entanto, devido a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-negativos, particularmente em amostras de equinos (com baixa carga viral), adequações ainda são necessárias para a otimização da reação de *multiplex* na detecção simultânea dos alvos de controle interno  $\beta$ -actina e RABV (região *leader* e gene da nucleoproteína) para serem utilizados nos laboratórios de diagnóstico de raiva.

Por outro lado, na comparação dos resultados entre a RT-qPCR LN34 no modo *multiplex* e o IVCC, observou-se maior desempenho na técnica molecular. A LN34 *multiplex* foi capaz de detectar o RABV em 22 amostras negativas no IVCC. Estes resultados demonstram o potencial do uso da estratégia do formato *multiplex* RT-qPCR em laboratórios de diagnóstico da raiva como teste confirmatório (exceto em amostras de equinos). Este sistema de *multiplex* possui a vantagem de redução de custos e de tempo de análise devido a diminuição da quantidade de reagentes e número de reações por amostra, podendo tornar viável ser adotada – com algumas restrições - como metodologia confirmatória pelos laboratórios de saúde pública nas atividades de vigilância epidemiológica (CHEN; SCHWARZ, 2017; MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002; SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Experimentos complementares de otimização são necessários para implicações mais definitivas sobre a utilização do formato *multiplex*.

O laboratório de diagnóstico do Instituto Pasteur recebe cerca de 4.000 amostras de SNC por ano e diversidade das espécies retrata uma razoável representatividade das variantes e linhagens genéticas do RABV circulantes no estado de São Paulo. A raiva da variante canina encontra-se controlada nesse estado e as variantes e linhagens genéticas circulantes são aquelas oriundas de quirópteros (CASTILHO et al., 2018).

Em estudo anterior, Chierato (2021) verificou que a RT-qPCR *onestep* com ensaio LN34 Pan-Lyssavirus *singleplex* apresentou caráter universal na detecção das principais variantes antigênicas e linhagens genéticas circulantes no Brasil, nos quais foram incluídas: de cão doméstico (AgV1 e AgV2), de canídeo silvestre (*Cerdocyon thous*), morcego hematófago *Desmodus rotundus* (AgV3), morcego frugívoro *Artibeus lituratus* (AgV3) e morcegos insetívoros (*Eptesicus* spp., *Histiotus* spp., *Lasiurus* spp.; *Molossus* spp., *Myotis* spp., *Nyctinomops* spp. e *Tadarida* spp.). e de sagui-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) (FAVORETTO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010).

Frente a isso, associado com os resultados obtidos no presente experimento, pode-se inferir que a LN34 no formato *singleplex* é uma ferramenta útil para o monitoramento da circulação da raiva no Brasil, por permitir um diagnóstico rápido e acurado, aparentemente contemplando todas as variantes e linhagens virais circulantes no Brasil, apresentando um desempenho superior (maior sensibilidade diagnóstica) em relação a prova padrão-ouro IFD, corroborando com as recomendações da OMS (RUPPRECHT et al., 2019).

## 2.7 CONCLUSÕES

- 1) O uso da RT-qPCR LN34 no formato *multiplex* para detecção simultânea do RABV (região *leader* e gene N) e do controle de amplificação interno  $\beta$ -actina deve ser utilizado com restrição, visto que em amostras com baixa carga viral (como por exemplo aquelas provenientes de equinos) existe a possibilidade de ocorrência de resultados falsos-negativos.
- 2) Devido a sua melhor eficiência e acurácia em relação a prova padrão-ouro (IFD), a técnica RT-qPCR LN34 formato *singleplex* pode ser indicado como teste confirmatório à IFD no diagnóstico da raiva no Brasil, corroborando com a recomendação da OMS.

## 2.8 REFERÊNCIAS

- AGIANNIOTAKI, E. I. et al. A TaqMan probe-based multiplex real-time PCR method for the specific detection of wild type lumpy skin disease virus with beta-actin as internal amplification control. **Molecular and Cellular Probes**, v. 60, p. 101778, dez. 2021.
- BLACK, E. M. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan™ technology. **Journal of Virological Methods**, v. 105, n. 1, p. 25–35, ago. 2002.
- BRASIL. Protocolo de Tratamento da Raiva Humana no Brasil. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.**, p. 1–44, 2011.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CARRIERI, M. L. et al. Laboratory diagnosis of equine rabies and its implications for human postexposure prophylaxis. **Journal of Virological Methods**, v. 138, n. 1–2, p. 1–9, dez. 2006.
- CASTILHO, J. G. et al. Analysis of rabies diagnosis in dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil. **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2369–2376, 8 set. 2018.
- CENTOAMORE, N. H. F. et al. Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 283, 1 set. 2020.
- CHEN, J.; SCHWARZ, E. Opportunities and Challenges of Multiplex Assays: A Machine Learning Perspective. In: GUEST, P. C. (Ed.). **Multiplex Biomarker Techniques. Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press, 2017. v. 1546p. 115–122.
- CHIERATO, M. E. R. **Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a detecção do vírus da raiva no Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 14 jun. 2021.
- DEUBELBEISS, A. et al. Real-Time RT-PCR for the Detection of Lyssavirus Species. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, p. 1–12, 16 out. 2014.
- EDWARDS, M. C.; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **Genome Research**, v. 3, n. 4, p. S65–S75, 1 fev. 1994.
- FAVORETTO, S. R. et al. Antigenic typing of brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 91–95, abr. 2002.
- FRANKA, R. et al. Current and future tools for global canine rabies elimination. **Antiviral Research**, v. 100, n. 1, p. 220–225, 2013.
- GIGANTE, C. M. et al. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for postmortem rabies diagnostics. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 1 maio 2018.

HAMPSON, K. et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003709, abr. 2015.

HEATON, P. R. et al. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2762–2766, nov. 1997.

HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, v. 23, n. 3, p. 504–511, set. 1997.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47–51, 2002.

MINOZZO, G. A. et al. Novel duplex RT-qPCR for animal rabies surveillance. **Transboundary and Emerging Diseases**, 28 abr. 2022.

MOLDOVAN, E.; MOLDOVAN, V. Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques. **Acta Marisiensis-Seria Medica**, v. 66, n. 3, p. 79–82, set. 2020.

OLIVEIRA, R. DE N. et al. Rabies virus in insectivorous bats: Implications of the diversity of the nucleoprotein and glycoprotein genes for molecular epidemiology. **Virology**, v. 405, n. 2, p. 352–360, set. 2010.

PORITZ, M. A. et al. FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26047, 19 out. 2011.

RODRIGUES, A. C. et al. A comparative study of direct fluorescent antibody, mouse inoculation, and tissue culture infection testing for rabies diagnoses. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 114426, fev. 2022.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. [s.l.] World Health Organization, 2018. v. 1

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. [s.l.] World Health Organization, 2019. v. 2

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 2

SOUZA, T. DE C. P. DE. **Estudo da distribuição do vírus da raiva (RABV) em amostras de sistema nervoso central e glândulas salivares de equinos naturalmente infectados**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 15 out. 2019.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **TaqMan™ Assay Multiplex PCR Optimization APPLICATION GUIDE** Thermo Fisher Scientific, , 18 jan. 2022. Disponível em: <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/taqman\\_optimization\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/taqman_optimization_man.pdf)>. Acesso em: 8 maio. 2022

WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, 12 jan. 2017.



WAKELEY, P. R. et al. Development of a Real-Time, TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection and Differentiation of Lyssavirus Genotypes 1, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2786–2792, jun. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Consultation on Rabies: Third Report. **WHO technical report series no. 1012**, p. 1–183, 2018.

XIAO, X.-L. et al. Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by multiplex real-time RT-PCR using an internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 159, n. 1, p. 23–28, jul. 2009.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus singleplex* apresenta potencial para ser utilizado como teste confirmatório a técnica de imunofluorescência direta (padrão-ouro) no diagnóstico da raiva em amostras animais.
- O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus singleplex* demonstra qualidades para substituir o IVCC como teste confirmatório à IFD – principalmente em amostras de equinos, onde a técnica de IVCC apresenta resultados menos satisfatórios.
- O ensaio RT-qPCR LN34 Pan-*Lyssavirus* no formato *multiplex* apresentou resultados inferiores em relação ao modo *singleplex*, principalmente em amostras de equinos com baixa carga viral, indicando necessidade de ajustes para melhoria do desempenho.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Rabies Virus Transcription and Replication. In: JACKSON, A. C. (Ed.). . **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 79p. 1–22.
- ARAÚJO, D. B. et al. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v. 1, 2008.
- BADRANE, H. et al. Evidence of Two Lyssavirus Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity . **Journal of Virology**, v. 75, n. 7, p. 3268–3276, abr. 2001.
- BANYARD, A. C. et al. Bats and Lyssaviruses. In: JACKSON, A. C. (Ed.). . **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 79p. 239–289.
- DAVIS, B. M.; RALL, G. F.; SCHNELL, M. J. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask). **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 451–471, 9 nov. 2015.
- DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). . **Laboratory techniques in rabies**. [s.l.] World Health Organization, 1996. p. 88–93.
- EL-SAYED, A. **Advances in rabies prophylaxis and treatment with emphasis on immunoresponse mechanisms** **International Journal of Veterinary Science and Medicine** Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, , 1 abr. 2018.
- FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Eighth Report of the International Committe on the Taxonomy of Viruses**. 8. ed. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005. v. 8
- FISHBEIN, D. B.; ROBINSON, L. E. Rabies. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 22, p. 1632–1638, 25 nov. 1993.
- FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. **The spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 1 abr. 2018.
- FOOKS, A. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 8. ed. [s.l.] World Organisation for Animal Health (OIE), 2018. p. 578–612.
- FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. **Journal of Virology**, n. 4, p. 547–566, jan. 2020.
- FRANKA, R. et al. Current and future tools for global canine rabies elimination. **Antiviral Research**, v. 100, n. 1, p. 220–225, 2013.
- GERMANO, P. M. L. et al. Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina. **Revista da Faculdade de Medicina**

**Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 1, p. 133, 15 mar. 1977.

GIGANTE, C. M. et al. Multi-site evaluation of the LN34 pan-lyssavirus real-time RT-PCR assay for postmortem rabies diagnostics. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 1 maio 2018.

GOETZE, A. The Laws of Eshnunna. **The Annual of the American Schools of Oriental Research**, v. 31, p. v, 1951.

GUICHARD, P. et al. Three dimensional morphology of rabies virus studied by cryo-electron tomography. **Journal of Structural Biology**, v. 176, n. 1, p. 32–40, out. 2011.

HAMPSON, K. et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003709, abr. 2015.

HOLLAND, J. et al. Rapid Evolution of RNA Genomes. **Science**, v. 215, n. 4540, p. 1577–1585, 26 mar. 1982.

HU, S.-C. et al. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 782–785, 2018.

ICTV. **Genus: Lyssavirus** International Committee on Taxonomy of Viruses, 2022. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus)>. Acesso em: 8 maio. 2022

JACKSON, A. C. Rabies. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 123p. 601–618.

LAURING, A. S.; ANDINO, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–8, jul. 2010.

LEUNG, A. K. C.; DAVIES, H. D.; HON, K.-L. E. Rabies: Epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis. **Advances in Therapy**, v. 24, n. 6, p. 1340–1347, nov. 2007.

MARSTON, D. A. et al. Comparative analysis of the full genome sequence of European bat lyssavirus type 1 and type 2 with other lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non-translated region. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 4, p. 1302–1314, abr. 2007.

MASTERS, P. S.; BANERJEE, A. K. Resolution of multiple complexes of phosphoprotein NS with nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 62, n. 8, p. 2651–2657, ago. 1988.

MCELHINNEY, L. M. et al. Laboratory diagnosis of rabies. In: FOOKS, A. R.; JACKSON, A. C. (Eds.). **Rabies**. 4. ed. [s.l.: s.n.]. p. 401–444.

MEBATSION, T.; WEILAND, F.; CONZELMANN, K.-K. Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 242–250, jan. 1999.

MORI, E. Raiva. In: FOCCACIA, R. (Ed.). **Tratado de Infectologia**. 6. ed. [s.l.] Atheneu, 2020. p. 937–964.

- NOKIREKI, T. et al. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 3, p. 593–596, 1 jun. 2018.
- OLIVEIRA, R. N. et al. Rabies virus diversification in aerial and terrestrial mammals. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1–12, 2020.
- RIEDEL, C.; HENNRICH, A. A.; CONZELMANN, K. K. **Components and Architecture of the Rhabdovirus Ribonucleoprotein Complex** Viruses MDPI AG, , 1 set. 2020.
- RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. [s.l.] World Health Organization, 2018. v. 1
- RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. **Laboratory techniques in rabies**. 5. ed. [s.l.] World Health Organization, 2019. v. 2
- RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. **Lyssaviruses and rabies: Current conundrums, concerns, contradictions and controversies** F1000Research Faculty of 1000 Ltd, , 2017.
- STEINHAEUER, D. A.; HOLLAND, J. J. Rapid Evolution of RNA Viruses. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 409–431, 1 out. 1987.
- TARANTOLA, A. Four Thousand Years of Concepts Relating to Rabies in Animals and Humans, Its Prevention and Its Cure. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 2, p. 5, 24 mar. 2017.
- TORDO, N. et al. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 11, p. 3914–3918, jun. 1986.
- VIRALZONE. **ViralZone** ViralZone. **Acessado: <<https://viralzone.expasy.org/22>>**, 2022. Disponível em: <[www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone)>. Acesso em: 8 maio. 2022
- WADHWA, A. et al. A Pan-Lyssavirus Taqman Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Highly Variable Rabies virus and Other Lyssaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, 12 jan. 2017.
- WARRILOW, D. et al. Sequence analysis of an isolate from a fatal human infection of Australian bat lyssavirus. **Virology**, v. 297, n. 1, p. 109–119, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. **WHO technical report series; 982**, v. 982, p. 1–139, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **First annual progress report: United Against Rabies Collaboration - Zero by 30 the Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-Mediated Rabies by 2030**. [s.l.] World Health Organization, Food and Agriculture Organization, World Organisation for Animal Health, Global Alliance for Rabies Control, 2019. v. 1
- YUHONG, W. Rabies and Rabid Dogs in Sumerian and Akkadian Literature. **Journal of the American Oriental Society**, v. 121, n. 1, p. 32, jan. 2001.

## 5. ANEXO A

Os resultados individuais para cada técnica diagnóstica encontram-se apresentados na tabela a seguir.

Quadro 1 – Resultados individuais das amostras quando submetidas à: Imunofluorescência Direta, Isolamento viral em cultivo celular, Isoalmento viral em camundongo, RT-PCR, LN34 Singleplex (LN34 e  $\beta$ -actina), LN34 Multiplex (LN34 e  $\beta$ -actina).

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
180108001687	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	27,31	28,2	26,6	29,7
180108001720	<i>Molossus molossus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	30,9	29,9	31,5	30,1
180108002006	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	21,4	21,6	21,8	22,2
180108003214	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	25,2	31,2	25	30,3
181733000096	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	29,9	28,3	29,9	29,4
181733000097	<i>Myotis nigricans</i>	Pos	Inc.	Neg	N/R	22,7	28,5	23,8	28,7
181733000107	<i>Myotis albescens</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	20,9	28,2	22,1	27,8
181733000138	<i>Myotis nigricans</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	14,7	18	15,1	18,5
181733000306	<i>Myotis nigricans</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	25,5	26,6	25,5	30,2
181733000535	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	17,9	22,7	19	23,2
182410000306	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	19,1	21,8	19,9	22,5
182410000325	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	29,4	23,8	25	24,6
182410000357	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	26,8	26,7	21,8	26,6
182410000364	<i>Artibeus planirostris</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	19,8	22,9	20	23,2
182410000404	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	27,9	26,8	24,6	26,8
182410000434	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	26,6	25,7	24,8	26,4
182410000435	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	18,6	23,4	23,6	28,3
182410000485	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	23,6	20,3	19,9	20,7
182410000536	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	29,5	30,2	0	31,1
182410000719	<i>Artibeus planirostris</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	16,4	14,3	18,9	15,6
182410001421	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	26,7	27,2	N/R	N/R
190108000288	<i>Myotis albescens</i>	Pos	Neg	Neg	N/R	22,5	23,7	22,2	23,2
190108000300	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	3	15,4	4,9	14,7
190108000302	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,1	18,8	11,7	22,7

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Cont. Quadro 1 – Resultados individuais das amostras quando submetidas à: Imunofluorescência Direta, Isolamento viral em cultivo celular, Isoalmento viral em camundongo, RT-PCR, LN34 Singleplex (LN34 e  $\beta$ -actina), LN34 Multiplex (LN34 e  $\beta$ -actina).

87

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108000311	Bovino	Pos	Neg	N/R	Detectável	21,5	25,4	17,6	25,1
190108000999	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	18,3	25,1	13,1	23,9
190108001044	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	16,7	18	21,3	22,9
190108001094	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	13,1	15,1	13,5	15,3
190108001162	Equino	Pos	N/R	N/R	Detectável	31,9	17,8	N/R	N/R
190108001294	<i>Myotis albescens</i>	Pos	N/R	N/R	N/R	9,2	12,3	N/R	N/R
190108001297	<i>Myotis nigricans</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	6,9	13,7	N/R	N/R
190108001396	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,5	17,7	10,9	17,3
190108001405	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	9,3	11,1	N/R	N/R
190108001407	<i>Myotis albescens</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	10,8	14,1	11,1	14,3
190108001428	Equino	Pos	N/R	N/R	N/R	19,4	13,9	N/R	N/R
190108001429	Equino	Pos	N/R	N/R	N/R	19,9	16	N/R	N/R
190108001430	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,1	18,3	11,9	18,1
190108001437	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,7	20	11,2	18,5
190108001512	Equino	Pos	Neg	N/R	N/R	21,4	16,1	25	17,1
190108001538	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	N/R	N/R	N/R	8,8	11,5	N/R	N/R
190108001543	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	10,7	12,7	10,9	13,5
190108001573	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	15,1	20,5	16,5	20,5
190108001626	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13	20	12,5	19,3
190108001630	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,6	17,8	11,4	17,6
190108001732	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	31,26	26,8	0	27
190108001792	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	28	23,1	20,2	23,7
190108001868	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	13,3	20,9	14,9	21,8
190108001965	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	7,7	13,9	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.



Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108001997	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,3	17,8	N/R	N/R
190108001998	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	12,6	19,6	N/R	N/R
190108002001	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	10,4	11,9	11,5	12,7
190108002012	Equino	Pos	Neg	N/R	Detectável	29,7	14,1	0	14,7
190108002013	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	15,9	15,4	N/R	N/R
190108002069	Ovino	Pos	Neg	N/R	N/R	14,5	16,3	15,2	17,2
190108002070	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	23,6	27,2	25,6	28
190108002096	Equino	Neg	Neg	N/R	Detectável	32,8	18,6	0	19,1
190108002129	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	9,9	14,7	N/R	N/R
190108002132	Cão	Pos	Pos	N/R	Detectável	11,9	13,9	11,8	14,9
190108002179	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	10,3	17,9	N/R	N/R
190108002181	Bovino	Pos	Inc.	N/R	Detectável	10,7	18,6	N/R	N/R
190108002206	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	14	14,4	N/R	N/R
190108002226	Equino	Pos	Neg	N/R	N/R	12,6	12,9	13,1	13,4
190108002260	Ovino	Pos	Neg	N/R	N/R	12,6	14,1	12,7	14,8
190108002261	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	5,7	15,6	5,7	15,2
190108002267	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,9	17,2	N/R	N/R
190108002291	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	17,6	18,8	16,7	20
190108002292	Bovino MR	Pos	N/R	N/R	Detectável	17,9	19,2	N/R	N/R
190108002295	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	8,7	14,7	9,9	15,1
190108002296	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	22,7	21,8	N/R	N/R
190108002306	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	17,2	24	N/R	N/R
190108002320	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	21,9	22,2	N/R	N/R
1901080002341	<i>Eumops glaucinus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	20,1	20,5	20,7	21,2

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108002387	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	14,5	19	13,8	18,3
190108002397	Não Identificado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,4	N/R	N/R
190108002415	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	5,1	15,7	N/R	N/R
190108002420	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	21,2	20,3	13,7	17,5
190108002421	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	21,8	21,1	N/R	N/R
190108002422	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	12	19,8	14,4	18,6
190108002427	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	12,5	20,7	0	24
190108002441	Javali	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,2	0	15,3
190108002442	Veado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,1	0	15,1
190108002443	Veado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,5	0	15,6
190108002444	Javali	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14	0	15,7
190108002445	Capivara	Neg	Neg	N/R	N/R	27,4	17,3	0	18,6
190108002446	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,7	0	13,3
190108002448	Tamanduá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	19,6	0	22,6
190108002502	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	12,2	16,8	13,5	18,2
190108002511	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	11,1	16,1	11,1	16
190108002512	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	9,5	16,6	9,9	16,5
190108002514	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	16,9	12,6	23,4	12,7
190108002516	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	10,3	17,2	N/R	N/R
190108002546	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	10	17,1	N/R	N/R
190108002549	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	16,2	14,8	17,2	15,2
190108002550	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,8	15	11,2	15,5
190108002561	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,7	19,9	N/R	N/R
190108002588	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,6	0	12,9

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108002622	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	21,9	31,2	N/R	N/R
190108002682	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	10	12,5	14,9	16
190108002683	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	9,6	17,1	10,1	18
190108002737	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	11,3	16,6	18,1	21,8
190108002739	Ovino	Pos	Neg	N/R	N/R	9,1	14,1	9,3	13,9
190108002766	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	26,3	26,3	N/R	N/R
190108002824	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	Detectável	17,5	18,4	N/R	N/R
190108002967	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	12,2	13,6	12,5	14,2
190108002969	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	9,3	13,7	9,8	13,9
190108003082	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	9,4	11,8	9,9	12,3
190108003084	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	12,4	17,1	16,3	21
190108003085	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	10,6	16,6	9,6	16
190108003100	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,6	19,5	12,2	18,8
190108003266	<i>Molossus molossus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	27,4	30,6	22,1	29,4
190108003309	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,2	20	14,2	20
190108003311	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	9,1	13	N/R	N/R
190108003312	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	31,1	11,3	27	13
190108003313	Bovino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	20,9	N/R	N/R
190108003314	Bovino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	18,3	0	14
190108003315	Bovino MR	Pos	N/R	N/R	Detectável	12,5	19,4	N/R	N/R
190108003316	Cão	Neg	N/R	N/R	Não detectável	0	17,2	N/R	N/R
190108003318	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,1	16,1	11	16,6
190108003390	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	22,8	20,3	11,4	21,4
190108003471	Gato	Pos	Pos	N/R	Detectável	5	11,3	5,9	12

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108003476	Bovino (MR)	Pos	N/R	N/R	Detectável	18,3	23,9	13	21,8
190108003477	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	13	18	12,1	18,1
190108003525	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	11,2	15,9	10,8	15,9
190108003537	Equino	Pos	Neg	N/R	N/R	20	17,2	22,4	18
190108003609	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	12,3	14,2	14,2	15,8
190108003623	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,5	18,9	N/R	N/R
190108003624	Ovino	Pos	Pos	N/R	N/R	6,6	14,3	5,6	14
190108003649	Primata não humano	Pos	Pos	N/R	Detectável	7,2	16,7	10,4	16,8
190108003688	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,5	23,1	N/R	N/R
190108003783	Equino	Pos	N/R	Pos	N/R	16,7	19	13,3	18
190108003804	Bovino	Pos	N/R	Pos	N/R	20,7	19,6	N/R	N/R
190108003811	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	5,5	13,6	10,4	14,6
190108003824	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	4	13,5	N/R	N/R
190108003834	Bovino	Pos	Inc.	N/R	Detectável	14,3	18,6	14,1	18,6
190108003911	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	10,3	16,4	N/R	N/R
190108003913	Bovino	Pos	N/R	N/R	Detectável	14,8	17,3	N/R	N/R
190108003953	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	17,9	19,9	N/R	N/R
190108003973	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	18,62	21,4	16,4	22
190108004011	Equino	Pos	Pos	N/R	Detectável	12,4	17,6	13,7	18,9
190108004047	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,5	23,1	N/R	N/R
190108004072	Ovino	Pos	Pos	N/R	N/R	13,8	16,9	11,8	15,8
190108004090	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,2	20	N/R	N/R
190108004110	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	20	24,9	N/R	N/R
190108004229	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	7	18,6	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
190108004268	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	15,3	20,6	N/R	N/R
190108004315	Ovino	Pos	Pos	N/R	N/R	12,7	18,6	11,9	18,3
190108004345	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	11,6	19,7	N/R	N/R
190108004456	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	18,1	16,8	14,1	17,5
190108004458	<i>Lasiurus blossevilli</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	9,9	16,6	N/R	N/R
190108004491	Gato	Pos	Neg	N/R	Detectável	12,4	18,2	17,6	20,1
190108004492	Cão	Pos	N/R	N/R	Detectável	19,5	14	N/R	N/R
190108004704	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	11,1	17,7	N/R	N/R
190108004729	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	31,6	23,8	N/R	N/R
190108004730	Bovino	Pos	Neg	N/R	N/R	11,6	15,9	N/R	N/R
190108004732	<i>Desmodus rotundus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	3,5	17	N/R	N/R
190108004999	Bovino	Pos	Pos	N/R	N/R	7,8	17,5	N/R	N/R
190108005206	Equino	Pos	Neg	N/R	N/R	15,5	17,4	16,5	18,4
191733000130	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	27,7	11,5	N/R	N/R
191733000142	<i>Myotis nigricans</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	24,9	26,3	4,6	11,3
191733000341	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	19	24,9	19,3	24,2
191733000408	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	9,9	10,7	N/R	N/R
191733000421	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	11,3	19,6	N/R	N/R
191733000439	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	28,5	24,9	N/R	N/R
191733000463	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	25,9	30,3	27,6	32,9
191733000614	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	N/R	N/R	N/R	25,9	32,1	N/R	N/R
191733000687	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	16,5	22	21,3	23,3
191733000749	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	20,3	26,8	22	27,2
191733000773	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	16,4	20,7	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
191733000860	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	21,7	25,8	N/R	N/R
191733000925	Gambá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	23,2	0	19,1
191733000941	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	22,3	23,6	N/R	N/R
191733001375	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	3,5	15,7	N/R	N/R
192410000301	<i>Eptesicus furinalis</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	26,7	24,3	N/R	N/R
192410000310	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	28,8	25,7	N/R	N/R
192410000335	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	29,2	24,9	21,5	24,7
192410000391	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,1	0	13
192410000392	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,8	0	13,4
192410000393	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,9	0	18,8
192410000399	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,9	N/R	N/R
192410000477	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	N/R	Pos	N/R	7,9	14,6	N/R	N/R
192410000569	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	13,6	16,4	N/R	N/R
192410000587	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	18,3	22,5	N/R	N/R
192410000614	Cão	Neg	Neg	N/R	Não detectável	22	13,6	26,3	14,4
192410000636	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Neg	N/R	N/R	3,8	20	N/R	N/R
192410000730	Cão	Neg	N/R	N/R	Não detectável	0	20	N/R	N/R
192410000765	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	14,1	14,8	N/R	N/R
200108000099	Capivara	Pos	N/R	N/R	Detectável	13,2	21,2	N/R	N/R
200108000104	Equino	Neg	Neg	N/R	Detectável	22,7	17,8	0	18,8
200108000121	Equino	Pos	Pos	N/R	N/R	19	13	19	13,6
200108000131	Equino	Neg	Neg	N/R	Detectável	26,4	14,1	0	15
200108000463	Capivara	Pos	Pos	Pos	Detectável	15,4	26,2	10,5	27,9
200108000464	Capivara	Pos	Pos	Pos	Detectável	9,4	14,7	9	14,8

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108001405	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	14,4	0	15,2
200108001746	Equino	Neg	N/R	N/R	Não detectável	26,4	11,2	0	13
200108001822	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,5	N/R	N/R
200108001825	Bovino	Neg	Inc.	N/R	Não detectável	18,8	19,3	33	22
200108001993	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	20,9	12,9	28,6	13,8
200108002033	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13	0	14,1
200108002038	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,2	N/R	N/R
200108002053	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,2	N/R	N/R
200108002060	<i>Molossus rufus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15	N/R	N/R
200108002089	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,3	N/R	N/R
200108002094	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,1	0	16
200108002097	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	28	N/R	N/R
200108002099	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,1	0	14
200108002105	<i>Molossus rufus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,3	N/R	N/R
200108002107	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,6	N/R	N/R
200108002110	<i>Artibeus planirostris</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,7	N/R	N/R
200108002112	<i>Carollia perspicillata</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	21,3	N/R	N/R
200108002113	<i>Glossophaga soricina</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,1	N/R	N/R
200108002171	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,7	N/R	N/R
200108002179	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,4	N/R	N/R
200108002183	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12	0	12,7
200108002319	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,8	N/R	N/R
200108002429	Lobo Guará	Pos	Pos	N/R	Detectável	8,9	12,2	7,2	12,8
200108002453	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	15,5	0	18

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108002494	Burro	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	14,7	0	13,6
200108002614	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,1	N/R	N/R
200108002616	Cotia	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,1	0	16,3
200108002622	Onça	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,7	0	16,5
200108002623	Onça	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,3	0	13,7
200108002625	<i>Nyctinomops aurispinosus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,7	0	14,2
200108002628	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,8	0	14,8
200108002650	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,8	0	15,2
200108002654	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,4	0	14,9
200108002669	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,9	0	13,7
200108002673	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13	N/R	N/R
200108002704	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,2	0	16,3
200108002706	Equino	Neg	Neg	N/R	N/R	23,9	12,1	26,7	13,7
200108002713	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,4	0	0
200108002714	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,1	0	19,5
200108002715	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,9	0	13,4
200108002719	Gambá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,3	0	18,7
200108002720	Gambá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,2	0	18
200108002725	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,9	0	17,2
200108002729	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	19,2	0	19,6
200108002730	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,9	N/R	N/R
200108002738	Veado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,9	0	17,7
200108002739	Onça	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,8	0	14,3
200108002744	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,4	0	18,9

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.



Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108002747	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,6	0	15,1
200108002752	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,4	0	17
200108002753	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,2	0	15,8
200108002762	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,1	0	16
200108002767	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,5	0	11,7
200108002771	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,4	0	12,7
200108002774	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,6	0	12,9
200108002776	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,8	0	12
200108002777	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,6	N/R	N/R
200108002778	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,8	0	12,3
200108002779	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,3	0	19,6
200108002780	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	9,6	0	11,1
200108002781	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,8	0	15,8
200108002782	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,6	0	14,7
200108002786	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,8	N/R	N/R
200108002794	Equino	Neg	Inc.	N/R	Não detectável	0	12,9	0	13,7
200108002795	Gato	Neg	Inc.	N/R	Não detectável	0	13,4	0	14,5
200108002796	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,7	0	12,1
200108002797	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,4	0	16,6
200108002798	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,9	0	14,2
200108002799	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	10	0	11,2
200108002801	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Inc.	N/R	Não detectável	0	16,8	N/R	N/R
200108002802	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,6	0	15
200108002803	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,5	0	12,1

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108002804	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17	0	18,5
200108002806	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,1	0	17,4
200108002808	<i>Molossus rufus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,7	0	20,1
200108002809	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18	0	20,9
200108002812	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,7	0	20,7
200108002813	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,3	0	15,7
200108002819	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,4	0	15,9
200108002821	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,8	0	15
200108002826	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,5	0	13,2
200108002827	Gambá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,1	0	18,2
200108002828	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,6	0	12
200108002829	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,8	N/R	N/R
200108002830	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,5	0	12,7
200108002832	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,3	0	15,7
200108002833	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,7	0	20,3
200108002834	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,6	0	25,3
200108002835	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,1	0	16,2
200108002836	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,3	0	17
200108002837	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,4	0	14,1
200108002838	Cão	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11,2	0	13
200108002846	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,9	N/R	N/R
200108002847	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,4	0	15,5
200108002848	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,4	0	12
200108002854	<i>Glossophaga soricina</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108002861	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	10,4	N/R	N/R
200108002862	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,1	0	15
200108002863	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,8	N/R	N/R
200108002865	Gato	Neg	Neg	N/R	N/R	0	11	N/R	N/R
200108002874	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,6	0	15,2
200108002897	Não Identificado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,9	N/R	N/R
200108002898	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,3	0	20
200108002899	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,6	N/R	N/R
200108002900	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,2	0	15,1
200108002912	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,5	0	20,4
200108002917	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	21,1	0	21,7
200108002939	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	14,2	0	16,3
200108002940	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	16,3	0	18,2
200108002947	Equino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	17,8	0	23,1
200108002955	Não Identificado	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,8	0	18,2
200108002963	<i>Glossophaga soricina</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,9	0	15
200108002965	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,5	N/R	N/R
200108002973	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,6	N/R	N/R
200108002981	<i>Glossophaga soricina</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,3	0	13,5
200108002988	<i>Myotis nigricans</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17	N/R	N/R
200108003015	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,8	N/R	N/R
200108003019	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	18,1	N/R	N/R
200108003089	Bovino	Neg	Neg	N/R	Não detectável	0	18,9	N/R	N/R
200108003098	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,4	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.

Cont. Quadro 1 – Resultados individuais das amostras quando submetidas à: Imunofluorescência Direta, Isolamento viral em cultivo celular, Isolamento viral em camundongo, RT-PCR, LN34 Singleplex (LN34 e  $\beta$ -actina), LN34 Multiplex (LN34 e  $\beta$ -actina).

99

Amostra	Espécie	IFD	IVCC	IVC	RT-PCR	Singleplex		Multiplex	
						LN34	$\beta$ -actina	LN34	$\beta$ -actina
200108003116	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,8	N/R	N/R
200108003118	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,4	N/R	N/R
200108003178	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,8	N/R	N/R
200108003179	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,4	N/R	N/R
200108003236	Equino	Neg	N/R	N/R	Não detectável	0	15,6	0	16,1
200108003350	Equino	Neg	N/R	N/R	Não detectável	0	16,9	0	17,4
200108003384	Equino	Neg	N/R	N/R	Não detectável	0	13,9	0	14,9
200108003397	Bovino	Neg	Neg	N/R	N/R	0	20,2	N/R	N/R
201733000495	<i>Artibeus lituratus</i>	Pos	Pos	N/R	N/R	3,5	12,6	N/R	N/R
202410000455	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,5	N/R	N/R
202410000461	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14,1	0	15,5
202410000474	<i>Histiotus velatus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	14	N/R	N/R
202410000504	<i>Molossus molossus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16,4	N/R	N/R
202410000521	<i>Eumops perotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	16	N/R	N/R
202410000603	Primata não humano	Neg	Neg	N/R	N/R	0	20,5	N/R	N/R
202410000622	Gambá	Neg	Neg	N/R	N/R	0	15,4	0	17,2
202410000632	<i>Artibeus lituratus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	12,6	0	14,5
202410000639	<i>Nyctinomus macrotis</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,4	0	14,7
202410000642	<i>Eumops glaucinus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	13,3	N/R	N/R
202410000644	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Neg	Neg	N/R	N/R	0	17,9	N/R	N/R

IFD: imunofluorescência direta; IVCC: isolamento viral em cultivo celular; IVC: isolamento viral em camundongo; MR: material ruim; Inc.: inconclusivo; N/R: não realizado; Pos: positivo; Neg: negativo.