

AVALIAÇÃO DA REDE LABORATORIAL NO CONTEXTO DA VIGILÂNCIA DA RAIVA NO ESTADO DO PIAUÍ



<https://doi.org/10.22533/at.ed.593112526028>

Data de submissão: 25/03/2025

Data de aceite: 03/04/2025

Luana Oliveira de Lima

Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI
<http://lattes.cnpq.br/0963680850436480>

Oriana Bezerra Lima

Fundação Municipal de Saúde, Teresina-PI
<http://lattes.cnpq.br/0419906649260833>

Bruno Leandro Maranhão Diniz

Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI
<http://lattes.cnpq.br/1073941956860191>

Vivian Gabrielle Costa e Silva

Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI
<http://lattes.cnpq.br/2688088310800608>

RESUMO: O diagnóstico laboratorial da raiva é imprescindível para desencadear as ações de controle, prevenção e vigilância da doença, visto que é uma zoonose com grande repercussão na saúde pública, devido sua alta letalidade. Dentro desse contexto, no Piauí dos 224 municípios, Teresina é a única cidade que realiza o diagnóstico da raiva através das técnicas de Imunofluorescência Direta e a Prova Biológica. Porém, novas diretrizes da Organização Mundial de

Saúde recomendam e consideram válida a técnica de biologia molecular, RT-PCR. No estudo, objetivou-se avaliar a estrutura e equipamentos existentes no LACEN-PI, relacionar os custos necessários para manutenção da PB, que é a técnica confirmatória ainda utilizada, bem como alguns aspectos legais que envolvem a questão bioética. Foi possível constatar que a PB pode ser substituída de forma viável pelo exame de biologia molecular RT-PCR, o que representará a adequação da Rede Laboratorial de Teresina aos aspectos referentes à bioética além da eficiência e precisão na velocidade de resposta aos casos suspeitos de raiva.

PALAVRAS-CHAVES: Raiva; Diagnóstico; Biologia molecular.

EVALUATION OF THE LABORATORY NETWORK IN THE CONTEXT OF RABIES SURVEILLANCE IN THE STATE OF PIAUÍ

ABSTRACT: Laboratory diagnosis of rabies is essential to trigger actions to control, prevent and monitor the disease, as it is a zoonosis with a major impact on public health due to its high lethality. Within this context, in Piauí, of the 224 municipalities, Teresina is the only city that diagnoses rabies using

Direct Immunofluorescence and Biological Testing techniques. However, new guidelines from the World Health Organization recommend and consider the molecular biology technique, RT-PCR, to be valid. The study aimed to evaluate the structure and equipment existing at LACEN-PI, relate the costs necessary for maintaining PB, which is the confirmatory technique still used, as well as some legal aspects involving the bioethical issue. It was possible to verify that PB can be viably replaced by the RT-PCR molecular biology test, which will represent the adaptation of the Teresina Laboratory Network to aspects related to bioethics in addition to efficiency and precision in the speed of response to suspected cases of rabies.

KEYWORDS: Rabies; Diagnosis; Molecular Biology.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença viral zoonótica, com letalidade de aproximadamente 100%, que representa uma grande preocupação para a saúde pública em diversas partes do mundo. (WHO, 2018; BRASIL 2024).

No Brasil, as principais estratégias de vigilância, prevenção e controle incluem a vacinação anual de cães e gatos, a profilaxia antirrábica em humanos, a notificação e investigação de casos, além do monitoramento da circulação viral; sendo essas medidas fundamentais para assegurar uma resposta eficiente e integrada às demandas de saúde pública. (VIEIRA, 2023; BRASIL, 2024).

Observa-se uma crescente mudança no perfil epidemiológico da raiva, impulsionada pela possível reintrodução da doença no ciclo urbano devido à transmissão de variantes originadas de reservatórios silvestres. (CERQUEIRA, 2023; VIEIRA, 2023).

Entre 2010 e 2024, foram registrados 48 casos de raiva humana no Brasil. Desses, nove foram transmitidos por cães, quatro por felinos, seis por primatas não humanos, 24 por morcegos e dois por raposas. A região Nordeste se destaca com o maior número de casos, totalizando 21 ocorrências nesse período. (BRASIL, 2024a).

No Piauí, o último caso de raiva humana registrado ocorreu em 2024 na cidade de Piripiri, provocado por um primata não humano. Registra-se que, em 2013, dois casos de raiva humana foram notificados no estado, um em Parnaíba e outro em Pio IX, ambos causados por primatas não humanos (BRASIL, 2024a).

No Brasil, nos últimos dez anos, foram registrados 241 casos de raiva em animais domésticos, sendo 186 casos em cães e 55 casos em felinos. Em cães, destaca-se que 33% das amostras foram positivas para a variante de canídeos silvestres e 15% para variantes de morcegos. Com um aumento significativo nos números de casos envolvendo-as nos últimos anos, a raiva silvestre se faz presente em diversas espécies: canídeos silvestres, primatas não humanos, morcegos entre outros. (BRASIL, 2024b).

É notável a mudança no perfil epidemiológico da raiva, destacando-se a transmissão por animais silvestres, especialmente por morcegos (variante AgV3), saguis-do-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e canídeos selvagens (AgV2*), enquanto os casos ligados a cães domésticos (AgV1 e AgV2) diminuíram. (CERQUEIRA, 2023).

Diante da diversidade de espécies envolvidas em sua transmissão, uma das principais estratégias para controlar a doença é vigilância laboratorial de animais suspeitos com o monitoramento da circulação do vírus em ambientes urbanos, rurais e silvestres. (BRASIL, 2019).

A confirmação bem como a vigilância epidemiológica da raiva necessita do diagnóstico laboratorial. Atualmente, o protocolo de diagnóstico padrão-ouro preconizado no Brasil é a Imunofluorescência Direta (IFD) seguida pelo exame confirmatório da Prova Biológica (PB). No entanto, em documento recente divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) lançam-se novas diretrizes, reconhecendo a Reação em Cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) como uma técnica primária e válida para o diagnóstico post mortem da raiva, podendo ser utilizada como alternativa à Prova Biológica (BRASIL, 2008; TAMURA, 2017; WHO, 2020; MORAES, 2023).

Em 2019, o LACEN-PR tornou-se pioneiro no Brasil ao substituir a prova biológica no diagnóstico da raiva, estabelecendo um precedente para que outros laboratórios adotem a mesma abordagem, explorando novas tecnologias, inovações e conhecimentos para transformar a realidade em benefício da sociedade, dos animais e do meio ambiente, promovendo assim a Saúde Única. (CORONA, 2020).

De acordo com o Guia para Diagnóstico em Saúde Pública do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021), outros laboratórios no Brasil também passaram a utilizar a biologia molecular em substituição à prova biológica, dentre eles estão: o Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná, Laboratório de Raiva do Instituto Evandro Chagas – Laboratório de Referência Regional (PA), Instituto Pasteur - Laboratório de Referência Nacional (SP).

O estado do Maranhão avançou significativamente no campo da saúde pública em 2023, ao implementar o diagnóstico molecular para a raiva no Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório Central (IOC/LACEN-MA). Esta iniciativa representou um marco importante para o diagnóstico da doença no estado, aprimorando a capacidade de detecção e resposta a essa grave zoonose. (GOV. MA, 2023)

De acordo com os dados da Secretaria de Saúde do Piauí (SESAPI), seis municípios possuem Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZ): em Barras, Floriano, Oeiras, Parnaíba, Picos, e na capital Teresina. (Figura 1).

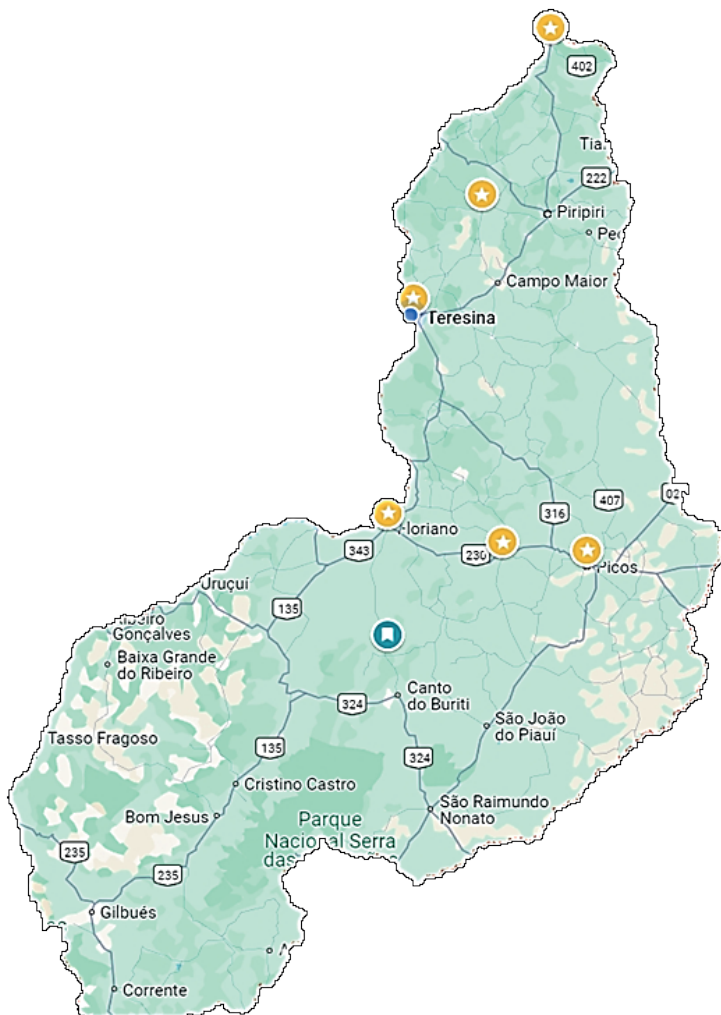


Figura 1 Unidades de Vigilância em Zoonoses do estado do Piauí. (Governo do Piauí)

Atualmente, a Rede de Laboratórios para o diagnóstico (★) da raiva no Piauí, conta apenas com o laboratório da Gerência de Zoonoses, da Fundação Municipal de Saúde de Teresina, o qual adota como método o teste de Imunofluorescência Direta, e a confirmação por meio da Prova biológica, conforme as diretrizes estabelecidas no Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva (BRASIL, 2008), sendo certificado pelo Ministério da Saúde e com treinamento pelo Instituto Pasteur, que é referência nacional no diagnóstico da doença.

O estado do Piauí conta com 224 municípios e 12 Regionais de Saúde sob a gestão da SESAPI: Planície Litorânea, Carnaubais, Cocais, Entre Rios, Vale do Sambito, Vale do Rio Guaribas, Chapada Vale do Rio Itaim, Vale do Canindé, Serra da Capivara, Vale dos Rios Piauí e Itaueiras, Tabuleiros do Alto Parnaíba e Chapada das Mangabeiras.

O presente trabalho tem o objetivo de relacionar a infraestrutura e insumos necessários para implantação do diagnóstico do RT-PCR, os custos para manutenção da Prova Biológica como forma de subsidiar os gestores na proposição de substituição da Prova Biológica e adoção da técnica de biologia molecular RT-PCR para o diagnóstico da raiva no Piauí, visando inclusive adequar o diagnóstico aos princípios da bioética, a não utilização de animais, como também permitindo a redução de custos quanto à manutenção dos biotérios.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas visitas aos laboratórios da Rede Estadual, localizados em Teresina, e à Universidade Federal do Piauí para avaliar a infraestrutura disponível. Paralelamente, foram consolidados os dados sobre a infraestrutura para realização dos diagnósticos na Gerência de Zoonoses (GEZOON) e no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), além da estimativa de custos para aquisição de insumos destinados aos exames de RT-PCR e Prova Biológica, seguida de análise comparativa entre os dois testes.

Além disso, foi realizada uma revisão bibliográfica usando como descritores '*raiva*', '*diagnóstico*', '*biologia molecular*', '*RT-PCR*' em diferentes bases de dados como Scielo e Pubmed, entre outras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

INFRAESTRUTURA E INSUMOS NECESSÁRIOS PARA IMPLANTAÇÃO

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA (LACEN)

Sabendo-se da existência de um setor de Biologia Molecular no LACEN foi realizada visita ao laboratório com o intuito de avaliar a estrutura existente bem como os equipamentos e materiais utilizados na execução da técnica do RT-PCR. O espaço é composto por um compilado de salas. Uma delas contém uma cabine de segurança biológica, duas centrífugas, e um ultra freezer. (Figura 2)



Figura 2: Laboratório de biologia molecular (LACEN). A) Cabine de segurança biológica; B) Centrífuga; C) Ultra freezer; D) Visão panorâmica da área. Fonte: Arquivo pessoal

A cabine de segurança é utilizada para manipulação e processamento das amostras durante algumas etapas do exame. A centrífuga permite a homogeneização dos tubitos para que nenhum resquício de amostra fique na tampa dos mesmos, minimizando os riscos de contaminação durante a manipulação.

Além disso, o espaço conta com três modelos de termocicladores (figura 3), onde são realizadas as etapas de desnaturação, anelamento e extensão do material genético; sendo dois deles para PCR convencional e um para RT-PCR.



Figura 3: Termocicladores. A) PCR convencional B) RT-PCR (Arquivo pessoal).

Mais recentemente, o laboratório também recebeu novos equipamentos que melhorarão e agilizarão o processamento das amostras: o pipetador automático e uma máquina para extração automatizada (figura 4). Os demais materiais necessários incluiriam os kits com reagentes (figura 5), os *primers* e pipetas manuais.

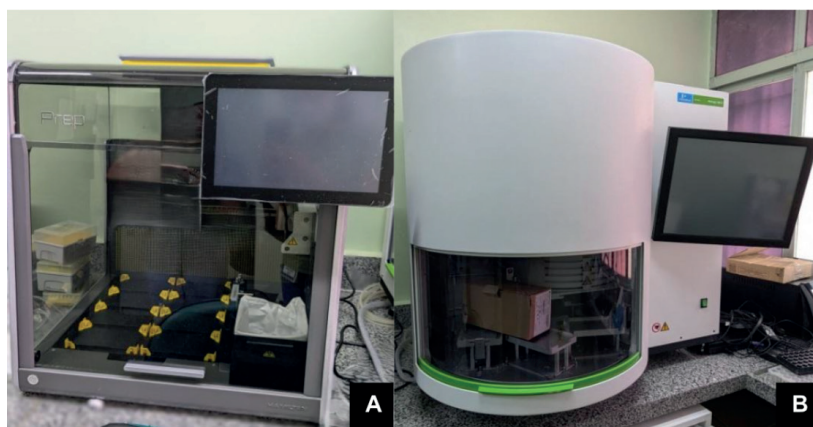


Figura 4: A) Pipetador automático; B) Extrator automatizado. (Arquivo pessoal)

Todos os equipamentos avaliados e identificados no LACEN/PI demandam de um alto investimento, porém tendo em vista que há uma estrutura montada e equipada para a realização dos exames, não haveria custos para aquisição dos insumos, pois a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública CGLAB/MS faz toda remessa para os Laboratórios Centrais conforme a demanda apresentada.



Figura 5: Kit de Reagentes (Arquivo pessoal)

Na Universidade Federal do Piauí, existem alguns equipamentos utilizados dentro do

campo da biologia molecular, que são os termocicladores para PCR convencional e RT-PCR. (Figura 6).



Figura 6: Termocicladores para PCR convencional e em Tempo real (Arquivo pessoal)

CUSTOS PARA MANUTENÇÃO DA PB

Conforme os dados da GEZOON são realizados em média 200 exames por ano, sendo inoculados 10 camundongos por exame. É importante ressaltar que a quantidade de exames realizados não é fixa, pois varia de acordo com a demanda recebida.

O biotério foi implantado na GEZOON em maio de 1996, com o objetivo da criação de camundongos para serem utilizados na realização da prova biológica. Sua estrutura física conta com quatro divisões internas (figura 7):

- A. Sala de inoculados (Infectório);
- B. Sala de higienização (Lavagem);
- C. Sala de Reprodução (Acasalamento);
- D. Sala de desmame.

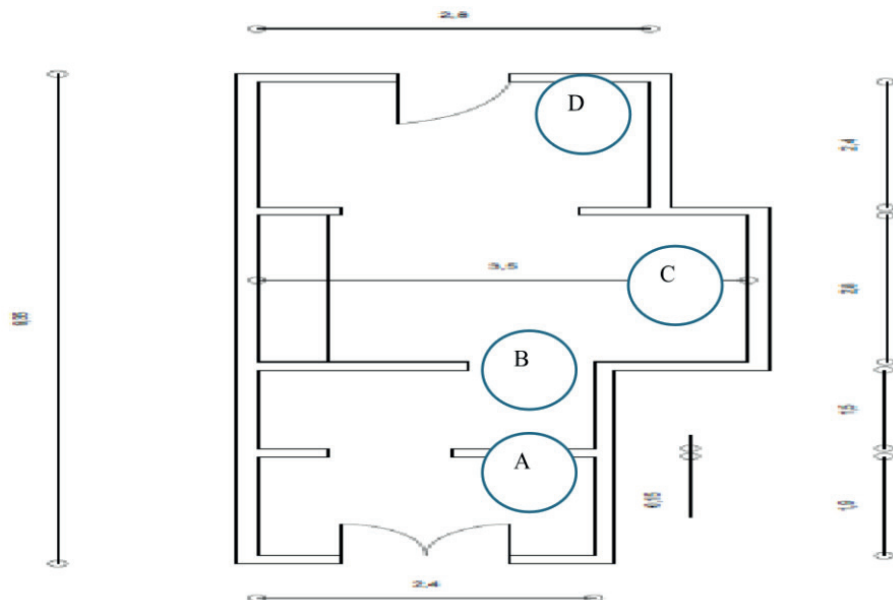


Figura 7: Layout da estrutura física do biotério. (POP GEZOON)

A manutenção do biotério envolve diversos custos que incluem: alimentação (ração para camundongos), água, substrato (maravalha), mão de obra diária e energia elétrica.

Os sacos de ração fornecidos aos animais são de 20 kg e o valor unitário é de R\$ 219,90. Atualmente, os camundongos do plantel encontram-se distribuídos em 62 gaiolas, sendo 54 gaiolas pequenas destinadas a animais em reprodução (figura 8) e oito gaiolas grandes para os animais em processo de desmame.



Figura 8: A) Gaiola de reprodução; B) Bebedouro 500 ml. (Arquivo pessoal)

Sabendo-se que a troca da água é realizada duas vezes na semana e que o conteúdo ainda existente será totalmente descartado, estima-se que sejam utilizados cerca de 1.860 litros de água mensalmente. O consumo com energia elétrica do setor é considerável, pois os climatizadores ficam ligados 24 horas, todos os dias, sendo 23,8 kWh/mês. Em relação à mão de obra, cinco colaboradores são responsáveis pelo setor, sendo quatro de nível médio, onde os valores do salário líquido variam entre R\$3.014,72 e R\$4.889,81, e um de nível de superior com o valor líquido de R\$ 14.114,34.

Entende-se que todos esses itens geram custos para que a PB seja realizada, e considerando que não haverá custos a mais em termos de instalação do laboratório Biologia Molecular e compra de equipamentos, os resultados apresentados indicam a viabilidade na substituição da prova padrão pela técnica de biologia molecular.

Independentemente do número de amostras que chegam ao laboratório é necessário, monitoramento diário do biotério e rastreamento de camundongos inoculados. Por outro lado, é possível concentrar a execução do RT-qPCR de acordo com o recebimento de amostras. (MARINHO, 2024)

Além disso, os aspectos atuais relacionados à manutenção da Prova Biológica no diagnóstico da raiva envolvem debates éticos, científicos e legais que giram em torno do uso de animais em experimentação. Inocular vários camundongos pode causar níveis elevados de estresse na profissional responsável pela inoculação desses animais, possivelmente levando à depressão e suas consequências. (CORONA, 2020)

Dentro da perspectiva, de que há um LACEN, contendo uma estrutura montada e equipada, além de pessoal habilitado para o processamento de amostras para realização da RT-PCR, e que o fornecimento dos insumos é realizado através da CGLAB/MS suprimindo o estoque de materiais necessários, acredita-se que não haveria maiores impedimentos para a substituição da Prova Biológica para técnica RT-PCR, considerada padrão-ouro.

Havendo a substituição, é imprescindível que haja uma sensibilização juntos aos municípios quanto aos envios das amostras coletadas, porque é necessária uma quantidade mínima para realização da técnica.

Segundo o estudo de Abarkan (2022), o processo burocrático envolvido na validação e implementação de técnicas substitutivas representa uma das principais barreiras a serem superadas para possibilitar a transição para uma ciência médica que garanta o bem-estar animal; porém isso não foi observado no presente trabalho. Especificamente no diagnóstico da raiva, essas barreiras incluem a ausência de investimentos e iniciativas institucionais, além da resistência por parte dos envolvidos, o que aponta para a oportunidade de incentivar a adoção de métodos alternativos. (BONES & MOLENTO, 2012)

No estudo foi demonstrado que o Lacen Piauí, recebeu equipamentos do Ministério da Saúde em 2024, além de insumos necessários para realização dos exames, incluindo kit de reagentes, primers; implicando diretamente na redução dos custos quanto a manutenção do laboratório e aquisição dos kits, faltando apenas a cabine biológica com nível de biossegurança adequado ao patógeno, para efetivamente iniciar a implantação do exame laboratorial por biologia molecular.

O trabalho evidenciou que a técnica de diagnóstico da raiva conhecida como “Prova Biológica”, que se baseia no isolamento viral de amostras suspeitas em camundongos, pode ser substituída de forma viável pelo exame de Biologia molecular RT-PCR.

CONCLUSÃO

A alteração e implantação do RT-PCR representará a adequação da Rede Laboratorial de Teresina, não somente no aspecto referente à bioética, mas também na economia, bem-estar animal e humano, eficiência e rapidez no diagnóstico, gerando o impacto positivo tanto na velocidade de resposta aos casos suspeitos de raiva, quanto na redução dos custos e na promoção de práticas laboratoriais éticas.

A implementação da técnica laboratorial RT-PCR no Piauí, ajudará a efetivação da vigilância da Raiva, pois facilitará o recebimento das amostras suspeitas enviadas pelos municípios, além de proporcionar que as ações de controle sejam desenvolvidas com segurança e fundamentação nas normativas sanitárias, pois atualmente não existe nenhum laboratório para o diagnóstico da Raiva, com exceção da FMS/Gezoon de Teresina.

REFERÊNCIAS

ABARKAN, F. Z.; WIJEN, A. M.; VAN EIJDEN, R. M.; STRUIJS, F.; DENNIS, P.; RITSKES-HOITINGA, M.; VISSEREN-HAMAKERS, I. **Animals**, v. 12, n. 20, p. 2757, 2022. Disponível em :<<https://doi.org/10.3390/ani12202757>>. DOI: 10.3390/ani12202757.

ACHA P. N.; SZYFRES, B. (org.). **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Chlamydioses, rickettsioses and viroses**. 3. ed. Washington, DC: PAHO, 2003. v. 2, p. 246-275. ISBN 92 75 31992 9.

ALVES, A. L.; BORGES, A. V. F.; REIS, K. B.; SOUZA E SILVA, L. C.; RIBEIRO, L. J. L. F.; PEREIRA, M. A. R.; JACÓ, R. B.; SILVA, W. F.; SOUZA, A. L.; COSTA, C.; RIBEIRO, L. J. L. F.; REIS, K. B.; SOUZA, L. C.; RIBEIRO, L. J. L. F.; PEREIRA, M. A. R.; JACÓ, R. B.; SILVA, W. F.; SOUZA, A. L.; COSTA, C. **Raiva bovina: Revisão**. PUBVET, v. 14, n. 7, p. 1–3. Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n7a602.1-3>>. DOI: 10.31533/pubvet.v14n7a602.1-3.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2008). **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Series A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília.

BRASIL. (2008a) **Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008**. Lei Arouca. Estabelece critérios e procedimentos para o uso de animais em experimentação

BRASIL. Ministério da Saúde (2019). Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. p.625-651.

BRASIL. Ministério da Saúde. (2024). **Guia de Vigilância em Saúde** 6ª ed. rev. Volume 3 Brasília, DF: Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_6ed_v3.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva Humana**. (2024a) <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-humana>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Raiva Animal**. (2024b) <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-animal>

BONES, V. C.; MOLENTO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **REVISTA VETERINÁRIA EM FOCO**, v. 10, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://www.periodicos.ulbra.br/index.php/veterinaria/article/viewFile/1172/888>>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Direct fluorescent antibody test**. May (2022). Disponível em: <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/direct_fluorescent_antibody.html>.

CERQUEIRA, T. A. P. M.; DA LUZ, R. M. A.; RIBEIRO, M. L.; AMORIM, G. C.; RAMOS, C. S.; DE ALMEIDA COELHO, J.; GITTI, C. B. **Mudança no perfil epidemiológico da raiva no Brasil**. Pubvet, v. 17, n. 09, p. e1455-e1455, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n9e1455>>. DOI: 10.31533/pubvet.v17n9e1455.

CHIERATO, M. E. R.; MORI, E. **Avaliação do ensaio RT-qPCR LN34 Pan-Lyssavirus para a detecção do vírus da raiva no Brasil**. 2021. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

CORONA, T. F.; MINOZZO, G. A.; CRUZ, E. C. R.; RIEDIGER, I. N. **LACEN/PR é o primeiro laboratório de saúde pública do Brasil a substituir a experimentação animal no diagnóstico da raiva**. Formação & Informação [Internet], v. 4, p. 4-6, 2020.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; CUNHA, E. M. S.; AGUIAR, E. A.; SILVA, L. H. Q.; SODRÉ, M. M.; KOTAIT, I. **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, p. 91-95, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000200007>>. DOI: 10.1590/S0036-46652002000200007.

FUNASA (2002). **Guia de vigilância epidemiológica** /Fundação Nacional de Saúde. 5ª edição, Brasília. p 175

GOMES, A. P.; ESPERIDIÃO-ANTÔNIO, V.; MENDONÇA, B. G.; BENEDITO, H. P. L.; VITORINO, R. R.; PRADO, M.; PRADO JUNIOR, P. P.; HENRIQUES, B. D.; SANTANA, L. A. (2012). **Raiva humana**. Revista Brasileira de Clínica Médica, v. 10, n. 4, p. 334-40, 2012. Disponível em: <https://www.sbcm.org.br/revistas/RBCM/RBCM-2012-04.pdf#page=69>.

GOVERNO DO MARANHÃO. (2023). **Governo anuncia expansão do diagnóstico da raiva no Maranhão durante celebração dos 104 anos do IOC/LACEN**. Disponível em: <https://www.ma.gov.br/noticias/governo-anuncia-expansao-do-diagnostico-da-raiva-no-maranhao-durante-celebracao-dos-104-anos-do-ioc-lacen>

KOTAIT, I., CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y. (2009). **Manual Técnico do Instituto Pasteur: raiva: aspectos gerais e clínica**. (pp. 49-49). Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/biblio-1074599>

LIMA, F. G.; GAGLIANI, L. H. **Raiva: aspectos epidemiológicos, controle e diagnóstico laboratorial**. UNILUS Ensino e Pesquisa, v. 11, n. 22, p. 45-62, 2014.

MARINHO, K. M.; MAGALHÃES, C. A. C.; AMORIM, L. A.; VIANNA, L. A.; TOBIAS, F. L.; LANGONI, H.; VIEIRA, L. F. P. **Feasibility of replacing the viral isolation technique in mice with RT-qPCR for the diagnosis of rabies**. *Ciência Rural*, v. 54, n. 8, p. e20230229, 2024. Disponível em:<<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230229>>. DOI: 10.1590/0103-8478cr20230229.

MORAES, G. C. D. **Inovação e ética: a adoção de técnicas substitutivas ao uso de animais no diagnóstico laboratorial da raiva**. 2023. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioética, Ética Aplicada e Saúde Coletiva) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

OIE. Terrestrial Manual (2018). **Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses)**. In: WOA. World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2022. Chapter 3.1.18, p. 578-614.

PEDRO, D. A. **Métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa: evolução e panorama atual do Brasil**. *Enciclopédia Biosfera*, v. 18, n. 37, 2021. Disponível em:<https://doi.org/10.18677/EnciBio_2021C28>. DOI: 10.18677/EnciBio_2021C28.

PEDRO, D. A.; BENTO, T. F. M. **Legislação sobre alternativas à experimentação animal e métodos reconhecidos entre 2014 e 2022 no Brasil**. *Pubvet*, v. 17, n. 04, p. e1375-e1375, 2023. Disponível em:<<https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n4e1375>>. DOI: 10.31533/pubvet.v17n4e1375.

DE SOUSA QUEVEDO, L.; HUGEN, G. G. P.; MORAIS, R. M.; QUEVEDO, P. S. **Aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e diagnóstico de raiva em animais de produção: Revisão**. *PubVet*, v. 14, p. 157, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n11a690.1-11>>. DOI: 10.31533/pubvet.v14n11a690.1-11.

RUPPRECHT, C. E.; FOOKS, A. R.; ABELA-RIDDER, B. (2018) **Laboratory techniques in rabies**. 5th edition, volume 1. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/310836>>.

SACRAMENTO, D.; BOURHY, H.; TORDO, N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. **Molecular and Cellular Probes**, v. 5, n. 3, p. 229-240, 1991. Disponível em:<[https://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90045-L](https://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90045-L)>. DOI: 10.1016/0890-8508(91)90045-L.

SANTOS, G. R. (2016). **Caracterização epidemiológica e molecular da raiva em bovinos no Estado de Pernambuco, Brasil**. Universidade Estadual Paulista (Unesp).

TAMURA, H. C. F. (2017). **Diagnóstico da Raiva: Estudo comparativo entre a efetividade dos testes de cultivo celular e inoculação viral em camundongos**.

VARGAS, A., ROMANO, A. P. M.; MERCHÁN-HAMANN, E. **Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017**. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 28, p. e2018275, 2019. Disponível em:<<https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000200001>>. DOI: 10.5123/S1679-49742019000200001.

VIEIRA, T. J. S. (2023). **Vigilância epidemiológica da raiva no Brasil em uma perspectiva de saúde única: desafios e estratégias**. Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC.

WHO. World Health Organization. (2018) **WHO expert consultation on rabies**, third report. Geneva.