



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

PARECER TÉCNICO Nº 388/2024/SEI-MCTI

Processo nº: 01245.003829/2024-30

Interessado: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Assunto: Parecer da Câmara Permanente de Métodos Alternativos do CONCEA/MCTI sobre a proposta de reconhecimento de métodos alternativos validados.

RESUMO

Em conformidade com o artigo 6º da Resolução Normativa CONCEA nº 54, de 10 de janeiro de 2022, a Câmara Permanente de Métodos Alternativos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, apresenta Parecer Técnico referente a proposta de Reconhecimento de quatro (4) Métodos Alternativos ao Uso de Animais para o diagnóstico da raiva, quais sejam: 1.Técnica de Imunofluorescência Direta (*Direct Antibody Fluorescent test - DAF*); 2. Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (*Direct Rapid Immunohistochemical Test (dRIT)*); 3. Técnicas moleculares com Reação de Transcriptase Reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction - RT-PCR*); 4. Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (*Rabies Tissue Culture Infection Test - RTCIT*). O parecer se baseia principalmente na Reprodutibilidade e Confiabilidade das técnicas. Testes *in vitro* como RT-PCR e imunofluorescência direta são altamente reproduzíveis e confiáveis, com sensibilidade e especificidade próximas a 100%, especialmente quando realizados em tecidos frescos ou adequadamente preservados, sobretudo se utilizam amostras que permitem a detecção do material genético do vírus em diversas amostras biológicas, incluindo tecido cerebral, saliva, folículos pilosos e líquido cefalorraquidiano. No caso do RTCIT, a técnica consiste na inoculação de amostras, como saliva ou tecido cerebral, em culturas celulares sensíveis, observando-se a replicação viral e os efeitos citopáticos típicos da infecção. Com base nos manuais, normas e diretrizes de referência nacional e internacional, esta câmara manifesta parecer FAVORÁVEL ao reconhecimento dos referidos métodos e destaca a validade e necessidade de adoção desses métodos alternativos em laboratórios brasileiros, em alinhamento com as diretrizes internacionais e o princípio dos 3Rs (Reducir, Refinar, Substituir).

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença viral aguda que afeta o sistema nervoso central de mamíferos, com uma taxa de letalidade quase absoluta. A encefalite que caracteriza a raiva é causada pelo vírus RABV, do gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*. Globalmente, resulta em cerca de 60.000 mortes humanas anualmente, principalmente em regiões da Ásia e África. As mordidas de animais infectados são a principal forma de infecção e como os sintomas podem ser semelhantes aos de outras doenças neurológicas, o diagnóstico clínico é insuficiente e potencialmente enganoso, sendo necessário o diagnóstico laboratorial.

Apesar de sua letalidade, a raiva é uma doença que pode ser erradicada e evitada com a implementação de estratégias eficazes de saúde pública e manejo epidemiológico. A ampla vacinação de animais domésticos e selvagens, juntamente com um sistema robusto de identificação de riscos, controle e prevenção, são medidas chave para o combate. O diagnóstico laboratorial desempenha um papel crucial neste contexto, pois permite a confirmação rápida de casos suspeitos, otimizando assim as ações de controle e prevenção, e contribuindo significativamente para os esforços de erradicação da doença.

O diagnóstico laboratorial da raiva animal envolve a coleta e envio do tecido nervoso do animal potencialmente infectado para um laboratório autorizado, onde deve ser feito um teste primário cujo resultado negativo demanda a realização de um teste secundário, para a confirmação do diagnóstico. O padrão ouro para o **teste primário** é a técnica de imunofluorescência direta (IFD). Outras técnicas aceitas atualmente pelos órgãos de referência global em saúde pública, por serem consideradas confiáveis, inclusive para o **teste confirmatório**, são: *Direct fluorescent antibody (DFA) test; Direct rapid immunohistochemistry test (dRIT); Pan-lyssavirus reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays; Rabies Tissue Culture Infection Test (RTCIT); Mouse Inoculation Test (MIT)*. Um resumo das possibilidades de testes diagnósticos está representado na tabela 1, com a nomenclatura técnica original em inglês, a respectiva tradução em português e a sigla original em inglês mantida em prol da universalidade técnica.

Tabela 1. Nomenclatura Técnica, tradução e Sigla

Nome técnico (inglês)	Tradução (português)	Sigla (Universal)
Direct fluorescent antibody test	Teste de Imunofluorescência Direta	DFA
Direct rapid immunohistochemistry test	Teste rápido de imuno-histoquímica	DRIT
Pan-lyssavirus reverse-transcription polymerase chain reaction assays	Teste de Reação em cadeia de polimerase transcriptase reversa	RT-PCR
Rabies Tissue Culture Infection Test	Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva	RTCIT

Mouse Inoculation Test	Teste de Inoculação em Camundongo	MIT
------------------------	-----------------------------------	-----

Das possibilidades consideradas confiáveis, o método diagnóstico menos recomendado atualmente para o diagnóstico da raiva é o MIT. Entretanto, este permanece como principal método realizado no Brasil para o **teste confirmatório**, contrariamente às recomendações globais atuais. Para que o Brasil acompanhe as tendências e diretrizes internacionais e atenda as próprias normas nacionais baseadas no princípio dos 3Rs, os laboratórios brasileiros precisam de incentivo e planejamento para se adaptar às mudanças necessárias para a implementação dos métodos alternativos ao MIT para a prova confirmatória. Nesse sentido, é crucial que as instâncias deliberativas e normativas responsáveis expressem claramente a existência da possibilidade e da necessidade de adoção dos métodos alternativos ao MIT.

Conforme as normas estabelecidas no artigo 6º da Resolução Normativa Concea nº 54/2022, o reconhecimento de métodos alternativos requer manifestação técnica da Câmara de Métodos Alternativos para subsidiar a decisão do CONCEA quanto ao reconhecimento de métodos alternativos validados. Em face disso, o presente parecer foi elaborado pela Câmara Permanente de Métodos Alternativos do CONCEA, referente à proposta de reconhecimento de quatro (4) métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial da raiva no Brasil. Devido a possibilidade de variações nas nomenclaturas técnicas referentes aos métodos de diagnóstico mencionados, destaca-se que o esquema de nomenclatura indicado na tabela 1 corresponde ao padrão adotado para fins do presente parecer.

1. Diagnóstico da Raiva: Importância e Métodos

O diagnóstico preciso da raiva é essencial para o controle, erradicação e manutenção da saúde pública. Ao identificar e confirmar casos de raiva rapidamente, é possível iniciar medidas de controle de surtos, vacinação em áreas de risco e prevenção da transmissão a humanos e outros animais. A detecção antecipada ajuda a limitar a propagação do vírus, reduzindo o impacto sobre a saúde pública e a economia, além de ser fundamental para estratégias de erradicação da doença em regiões específicas, contribuindo para a segurança de comunidades e a saúde animal.

Em âmbito global, os casos de óbito por doenças com sinais neurológicos potencialmente decorrentes da presença do vírus da raiva, em mamíferos não-humanos, devem ser encaminhados para o diagnóstico laboratorial da raiva para a confirmação, ou não, da doença e para que sejam adotadas medidas de controle. As amostras de sistema nervoso central a serem encaminhadas aos laboratórios de diagnóstico devem ser coletadas de animais mortos ou submetidos à eutanásia, de acordo com os critérios epidemiológicos vigentes.

O encaminhamento de amostras é importante tanto para a pesquisa de vírus circulante na população animal e análise da situação epidemiológica da região, como para a determinação ou não de um tratamento profilático aos indivíduos expostos. A análise *ante mortem*, referente aos indivíduos humanos, permite intervenção precoce em suspeitas, enquanto a *post mortem*, referente aos indivíduos não humanos, confirma o diagnóstico para ações de saúde pública. As técnicas de biologia molecular, como o RT-PCR representam, na atualidade, importantes instrumentos para o diagnóstico *ante mortem* a partir da saliva, do folículo piloso e do líquido cefalorraquidiano (LCR). Nenhuma das técnicas de diagnóstico, isoladamente, apresenta 100% de sensibilidade, mas o conjunto delas aumenta consideravelmente a probabilidade da confirmação laboratorial de uma suspeita clínico-epidemiológica de raiva.

Em geral, os procedimentos diagnósticos para a raiva animal são *post mortem*, recomendando-se o uso de amostras de tecidos do tronco cerebral, hipocampo, córtex cerebral e cerebelo para avaliação. O método padrão ouro para o diagnóstico primário da raiva é o teste de imunofluorescência direta (DFA). O diagnóstico positivo é conclusivo, porém o diagnóstico negativo não exclui a possibilidade de raiva. Por esse motivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda diferentes métodos quando a confirmação dos resultados é necessária. Similarmente, a legislação brasileira exige pelo menos duas técnicas para a confirmação do diagnóstico de raiva em casos de resultado negativo no primeiro teste.

Tradicionalmente, os resultados da DFA eram normalmente confirmados pelo teste de inoculação em camundongos (MIT), cujas desvantagens motivaram o desenvolvimento e adoção de abordagens alternativas para o diagnóstico confirmatório da raiva. Atualmente há métodos mais éticos e cientificamente vantajosos que cumprem, de modo eficiente, o mesmo objetivo que o MIT. Consequentemente, muitos laboratórios ao redor do mundo já descontinuaram ou estão em processo de descontinuar o uso de animais para a etapa confirmatória do diagnóstico da raiva. Nesse sentido, há uma evidente tendência mundial de substituição da inoculação animal por métodos alternativos. Destaca-se a recomendação literal o “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals”, atualizado pela World Organisation for Animal Health (WOAH) em maio de 2023, uma das referências mais importantes do mundo no assunto:

“Devido a inexistência de lesões patognomônicas macroscópicas e sinais clínicos específicos e conclusivos para a raiva, o diagnóstico confirmatório só pode ser feito em laboratório. As técnicas diagnósticas são preferencialmente realizadas em tecido do sistema nervoso central (SNC) extraído do crânio. Recomenda-se que a detecção e identificação do agente seja realizada por meio de diagnósticos primários, como o teste de imunofluorescência direta (DFA), o teste rápido direto de imuno-histoquímica (dRIT) ou ensaios de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa para todos os lyssavírus (RT-PCR). Quando conduzidos adequadamente, os testes DFA, dRIT e RT-PCR fornecem um diagnóstico confiável em 98–100% dos casos para todas as cepas de lyssavírus. Em laboratórios devidamente equipados, a RT-PCR convencional e em tempo real pode fornecer resultados rápidos. Em casos de resultados inconclusivos dos testes diagnósticos primários (teste DFA, dRIT ou RT-PCR pan-Lyssavirus), são recomendados testes confirmatórios adicionais na mesma amostra ou repetição dos testes diagnósticos primários em outras amostras. **Sempre que possível, o isolamento do vírus em cultura celular deve substituir os testes de inoculação em camundongos.** (WOAH, 2023)

Contudo, no Brasil, o uso dos métodos alternativos ao MIT ainda é exceção. Outro fator que merece atenção quanto ao diagnóstico da raiva no Brasil, é a dificuldade de coleta e armazenamento adequados das amostras, pois os抗ígenos e o genoma de RNA viral podem ser degradados se as amostras permanecerem por longos períodos em temperaturas inadequadas. Em locais com condições, frequentes no Brasil, garantir a qualidade da amostra durante o transporte e armazenamento em locais sem condições adequadas é um desafio. A existência de barreiras, dificuldades e falhas no âmbito da coleta e envio de amostras para a análise laboratorial prejudicam a identificação, mapeamento e notificações referentes à doença e consequentemente, os planos de profilaxia e combate.

2. O método de diagnóstico a ser substituído: Teste de Inoculação em Camundongos (MIT)

O Mouse Inoculation Test (MIT), ou Teste de Inoculação em Camundongos, é um método tradicional utilizado para confirmar a presença do vírus da raiva. Esse teste envolve a inoculação de amostras biológicas suspeitas, geralmente tecido cerebral, em camundongos de

laboratório, seguido pela observação desses animais por sintomas de raiva.

Em uma descrição geral breve, o procedimento do MIT envolve:

- Preparação da Amostra: O tecido cerebral do animal suspeito de estar infectado com o vírus da raiva é coletado e preparado para inoculação;
- Inoculação: O extrato de tecido preparado é inoculado diretamente no cérebro de camundongos de laboratório saudáveis, geralmente através de uma injeção intracerebral;
- Observação: Após a inoculação, os camundongos são observados diariamente por um período de até 28 dias para o desenvolvimento de sintomas característicos da raiva, como paralisia, alterações de comportamento e eventual morte;
- Confirmação: Se os camundongos apresentarem sintomas de raiva, o diagnóstico pode ser confirmado por exames adicionais, como a identificação do antígeno viral por imunofluorescência direta no tecido cerebral dos camundongos infectados.

No passado, o MIT foi considerado o padrão-ouro para a **confirmação** da raiva devido à sua alta sensibilidade. No entanto, o teste tem desvantagens significativas, como o longo período de observação necessário, o uso de animais vivos, questões éticas relacionadas à experimentação animal e o risco de exposição dos manipuladores ao vírus. Devido a essas preocupações, há uma tendência mundial crescente em substituir o MIT por métodos alternativos, como o RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa) e o teste de imunofluorescência direta (DFA), que são mais rápidos, não exigem o uso de animais e minimizam os riscos para os manipuladores.

3. Métodos Alternativos uso de animais para o Diagnóstico da Raiva, candidatos ao Reconhecimento pelo CONCEA.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em trabalho conjunto com a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH, anteriormente conhecida como OIE) e com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), publicou, em 2019 a, 5ª edição do *Laboratory Techniques in Rabies* (em livre tradução: Técnicas Laboratoriais em Raiva), que contém as diretrizes internacionais e a descrição detalhada das técnicas recomendadas para o diagnóstico da raiva humana e animal. A publicação dá respaldo técnico à iniciativa global que visa a atingir zero mortes pela raiva humana até 2030, bem como compila os estudos mais avançados e recentes na área, sendo um guia definitivo para os laboratórios de vigilância da raiva, inclusive aos laboratórios que fazem parte da rede do Ministério da Saúde (MS) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O "Laboratory Techniques in Rabies" é uma das referências mais importantes do mundo no tema da raiva, especialmente no que diz respeito aos métodos de diagnóstico laboratorial da doença.

A literatura científica atualizada e os manuais de referência em saúde mundial, incluindo publicações oficiais da OMS, da WOAH, do CDC, dentre outros, sustentam, de modo convergente, que a técnica considerada padrão-ouro para o teste primário da raiva é a Imunofluorescência Direta (DFA), devido ao baixo custo, à rapidez de resultados e às taxas elevadas sensibilidade e especificidade. Contudo, devido ao risco de resultados falsos, é preciso contar com a possibilidade de realização de protocolos de diagnósticos da raiva que englobam mais de uma técnica, para fins de confirmação. Os métodos sugeridos para utilização em conjunto com a DFA são o Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (DIRT), Técnicas Moleculares com Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR) e o Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT).

A partir de estudo aprofundado da literatura científica internacional, bem como das recomendações e diretrizes de referência mundial em diagnósticos laboratoriais e saúde pública, a câmara permanente de métodos alternativos considera que as técnicas de diagnóstico da raiva DFA; DIRT; RT-PCR e RTCIT correspondem perfeitamente ao conceito de método alternativo validado, estabelecido pela RN 54. Nesse sentido, esta câmara entende que cabe ao CONCEA o Reconhecimento dos 4 métodos de diagnóstico da raiva, fazendo-se cumprir a legislação nacional vigente e as diretrizes internacionais baseadas no princípio dos 3Rs.

3.1 Descrição dos métodos alternativos ao MIT, candidatos ao Reconhecimento pelo CONCEA

3.1.1. Descrição da Técnica de Imunofluorescência Direta (DFA)

A técnica consiste na detecção do antígeno do vírus da raiva em amostras de tecido cerebral. O procedimento envolve a fixação de cortes finos de tecido em lâminas, que são então incubadas com anticorpos anti-raiva conjugados com um fluorocromo. Se o antígeno do vírus da raiva estiver presente na amostra, formar-se-á um complexo antígeno-anticorpo que pode ser visualizado sob um microscópio de fluorescência. A presença de fluorescência indica uma reação positiva, confirmando a presença do vírus da raiva na amostra. Esta técnica é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da raiva em amostras *post-mortem* devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A técnica envolve as seguintes etapas principais:

- Preparação da Amostra: O tecido cerebral é coletado e preparado em lâminas de microscópio, criando cortes finos que são fixados na lâmina para análise.
- Aplicação de Anticorpos: Anticorpos específicos contra o vírus da raiva, que foram marcados com um fluoróforo (uma substância química que emite fluorescência), são aplicados sobre a amostra na lâmina. Esses anticorpos são projetados para se ligar especificamente aos antígenos do vírus da raiva presentes na amostra.
- Lavagem: Após um período de incubação que permite a ligação dos anticorpos aos antígenos, a lâmina é lavada para remover quaisquer anticorpos não ligados.
- Exame ao Microscópio: A lâmina é então examinada sob um microscópio de fluorescência. A presença de fluorescência indica a ligação dos anticorpos marcados aos antígenos do vírus da raiva, confirmando a infecção.

A vantagem do método DFA inclui sua alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção rápida e precisa do vírus da raiva. Além disso, a técnica pode ser realizada em poucas horas, o que é crucial para a tomada de decisões rápidas em relação à profilaxia pós-exposição em casos suspeitos de raiva.

3.1.1.1 Estado da arte da técnica DFA para diagnóstico laboratorial da raiva

A técnica DFA permanece o padrão ouro para o diagnóstico rotineiro da raiva em animais devido à sua velocidade, acessibilidade e eficácia bem estabelecida. É o principal método de referência recomendado por organizações como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Validação e Padronização: Processos extensivos de validação e a padronização internacional de protocolos garantiram resultados consistentes e confiáveis do DFA em laboratórios. Sensibilidade e Especificidade: Quando realizado em tecido cerebral fresco, o DFA apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 100%. Acessibilidade e Custo: O DFA é relativamente acessível em muitos laboratórios de diagnóstico globalmente e é considerado menos caro que alternativas baseadas em métodos moleculares.

3.1.2. Descrição da técnica do Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (DIRT)

O Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (DIRT) para o diagnóstico da raiva é uma técnica de coloração por peroxidase de estreptavidina-biotina usada para detectar抗原os do lyssavirus. Esta técnica tem sido amplamente utilizada nos últimos anos para aprimorar a vigilância laboratorial da raiva em regiões como África, Ásia e as Américas, mostrando sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste de imunofluorescência direta. O procedimento do DIRT inclui

- Preparação de impressões em lâminas de microscópio de tecidos suspeitos do SNC, como o cérebro e o cerebelo. Essas lâminas são secas ao ar, imersas em formalina tamponada e processadas com uma série de reagentes, incluindo peróxido de hidrogênio, soro polyclonal anti-raiva, e um complexo de estreptavidina-peroxidase.
- Após a incubação com esses reagentes, as lâminas são lavadas e incubadas com o substrato cromogênico AEC, resultando em uma coloração que, se positiva, revela a presença do antígeno viral.

O teste exige equipamentos básicos de laboratório, incluindo um microscópio de luz, e pode ser realizado de maneira relativamente rápida e econômica.

3.1.2.1 Estado da arte do Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (DIRT) para o diagnóstico da raiva

O DIRT oferece uma alternativa válida para o diagnóstico rápido da raiva. É mais sensível do que alguns testes histológicos tradicionais. É recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em certas situações, particularmente quando outros métodos como o DFA não estão disponíveis ou apresentam resultados inconclusivos. Em termos de validação e padronização, embora o DIRT tenha uma padronização mais recente e menos definida em comparação ao DFA que já se considera um método antigo, o DIRT se mostra cada vez mais seguro, e sob constante refinamento de protocolos. O DIRT apresenta a sensibilidade e especificidade altas no diagnóstico da raiva. Em termos de implementação da técnica, o DIRT é mais acessível do que as técnicas baseadas em biologia molecular, semelhante ao DFA. No entanto, ele exige tecidos cerebrais fixados por formol que podem comprometer outras técnicas, além de requerer treinamento especializado em imunohistoquímica. Um estudo de 2020 que comparou a eficácia e custo-efetividade entre os testes DFA e o dRIT em mercados de carne de cachorro na Nigéria, constatou que o dRIT é não apenas um ensaio diagnóstico eficaz que pode ser usado rotineiramente para diagnosticar a raiva, mas é a opção mais custo-efetiva entre todos os métodos recomendados pela OMS.

3.1.3. Descrição da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR pan-lyssavirus é uma técnica vital para a detecção de ácidos nucleicos virais e sequências de lyssavirus. O procedimento envolve:

- Preparação de um master mix, a distribuição em tubos, e a adição do template em uma sala separada para evitar contaminação cruzada.
- A técnica utiliza parâmetros específicos de ciclagem para a primeira e segunda rodada da RT-PCR, visando otimizar a sensibilidade e especificidade do teste.
- A análise dos produtos da RT-PCR é realizada por eletroforese em gel de agarose, permitindo a visualização de bandas específicas que indicam a presença do vírus.

A RT-PCR é reconhecida por sua capacidade de detectar uma ampla gama de espécies de *lyssavirus* com alta sensibilidade e especificidade, tornando-a uma ferramenta indispensável para o diagnóstico e pesquisa da raiva.

3.1.3.1 Estado da Arte da técnica RT-PCR para o diagnóstico da raiva

O RT-PCR revolucionou o diagnóstico da raiva devido à sua sensibilidade excepcional e adequação para vários tipos de amostra (incluindo tecido decomposto). Serve como uma ferramenta vital em testes confirmatórios ou casos em que o DFA produz resultados inconclusivos. Em termos de validação e padronização, os métodos de RT-PCR para detecção da raiva passaram por validação rigorosa, com protocolos padronizados bem estabelecidos. E o RT-PCR oferece alta sensibilidade e especificidade, superando técnicas diagnósticas tradicionais e capaz de detectar até níveis baixos de RNA viral. Quanto a acessibilidade, as principais limitações do RT-PCR residem na sua natureza intensiva de recursos. Requer equipamento especializado e expertise, assim incorrendo em maiores custos e limitando a acessibilidade em ambientes com recursos limitados.

3.1.4. Descrição do Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT)

O Teste de Infecção Viral em Cultivo Celular (RTCIT) é uma técnica fundamental para a detecção e identificação de vírus. Este método envolve a introdução de uma amostra potencialmente infectada em culturas de células sensíveis e a observação dessas culturas para sinais de infecção viral, como a formação de efeito citopático (ECP). As etapas gerais do RTCIT incluem:

- Preparação da Amostra: A amostra contendo o vírus (por exemplo, saliva, tecido cerebral de um animal suspeito de raiva) é preparada para inoculação. Isso pode incluir a clarificação da amostra por centrifugação e tratamento com antibióticos para minimizar a contaminação bacteriana. Seleção da Linha Celular: Diferentes vírus requerem diferentes linhas celulares para o crescimento ótimo. Linhas celulares comumente usadas incluem células Vero, células BHK (Baby Hamster Kidney) e células MNA (Mouse Neuroblastoma).
- Inoculação: A amostra é inoculada na cultura de células selecionada. As culturas são então incubadas sob condições adequadas para o crescimento celular e viral.
- Monitoramento do Efeito Citopático (ECP): As culturas são regularmente observadas sob um microscópio para detectar mudanças morfológicas nas células que indicam infecção viral.

O RTCIT é um método valioso para o isolamento e identificação de vírus, incluindo o vírus da raiva, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. No entanto, este método pode ser demorado e requer instalações laboratoriais especializadas, além de pessoal treinado para cultivo de células e interpretação de resultados.

3.1.4. Estado da arte da técnica Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT)

O RTCIT representa uma alternativa preferida aos testes de inoculação animal (MIT) por sua sensibilidade similar, resultados mais rápidos e benefícios éticos. É frequentemente empregado como um teste secundário ou confirmatório. Em termos de validação e Padronização, os procedimentos de RTCIT foram validados extensivamente, com protocolos reconhecidos pela OMS e CDC. Quanto à sensibilidade e especificidade, os resultados mostram sensibilidade e especificidade muito altas em comparação ao método MIT de referência. E em termos de acessibilidade e Custo, como o RTCIT depende de instalações de cultura celular, ele pode ser menos acessível que o DFA e envolver maiores custos iniciais para a implementação, mas vantagens econômicas posteriores.

3.2 Parâmetros para validação e confiabilidade dos Métodos Alternativos ao MIT

A RN 54 do CONCEA define método alternativo validado:

“método que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa e cuja confiabilidade e relevância foram determinadas por meio de um processo que envolve os estágios de desenvolvimento, pré-validação, validação e revisão por especialistas, e em conformidade com os procedimentos realizados por centros para validação de métodos alternativos ou por estudos colaborativos internacionais, podendo ter aceitação regulatória internacional, que visem atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: a) não utilizem animais; b) usem espécies de ordens inferiores; c) empreguem menor número de animais; d) utilize sistemas orgânicos *ex vivos*; ou e) diminuam ou eliminem o desconforto;”

Considerando as determinações da RN 54, o ponto de partida para a análise de uma proposta de Reconhecimento de MA é a identificação do status dos métodos candidatos ao reconhecimento em termos de validação. Os métodos Reconhecidos pelas RNs anteriores do CONCEA referiam-se a desfechos de toxicologia ou farmacologia e visavam o reconhecimento de métodos descritos na OECD ou Farmacopéias internacionais. Nesse caso, por se tratar da área de diagnóstico laboratorial é preciso se levar em consideração parâmetros de avaliação e manuais de referência na área, analogamente a OECD e a farmacopeia para em suas áreas de relação. Neste parecer, foram usados como parâmetros para a análise do status de validação conteúdos informativos e normativos referentes aos atores e elementos agrupados na sequência.

3.2.1 Manuais e Diretrizes da OMS e C e outros Manuais Técnicos de Referência Laboratorial.

Foram analisados o site oficial da OMS e suas publicações sobre raiva, o *Laboratory Techniques in Rabies*, 5^a edit, vol 1 e 2, e o Manual Terrestre, da WOAH. Capítulo 3.1.18, 2023.

3.2.2 Publicações de Centros de Controle e Prevenção de Doenças, como o CDC;

Foram consultados recursos detalhados sobre técnicas laboratoriais e procedimentos de segurança na página oficial do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/index.html>.

Segundo a recomendação oficial do CDC, dos Estados Unidos, para suspeitas de raiva em animais, o diagnóstico da raiva pode ser confirmado após a detecção do vírus em qualquer parte do cérebro afetado. No entanto, para descartar a raiva, o teste deve incluir tecido de pelo menos dois locais no cérebro, preferencialmente o tronco cerebral e o cerebelo. O teste exige a eutanásia do animal e o procedimento leva cerca de 2 horas, além do tempo necessário para a coleta e envio do material ao laboratório. Anualmente, nos Estados Unidos, mais de 120.000 animais são testados para raiva, e aproximadamente 6% são diagnosticados com a doença. A proporção de animais positivos varia consideravelmente entre as espécies, de menos de 1% em animais domésticos a mais de 10% em espécies selvagens. Os resultados de um teste de raiva geralmente estão disponíveis dentro de 24 a 72 horas após a coleta e eutanásia do animal.

O órgão destaca que o conhecimento em saúde pública e estudos de patogênese mostram que não é necessário sacrificar e testar todos os animais que mordem ou expõem potencialmente uma pessoa à raiva. Para animais com baixa probabilidade de ter raiva, como cães, gatos e fúrios, períodos de observação (10 dias) podem ser adequados para descartar o risco de exposição humana à raiva e a consulta com um oficial de saúde após uma possível exposição ajuda a determinar o melhor curso de ação com base nas recomendações atuais.

No caso de suspeita de raiva em humanos, o diagnóstico antes da morte (*ante-mortem*), requer vários testes; pois um teste único não é suficiente. Os testes são realizados em amostras de saliva, soro, fluido espinhal e biópsias de pele de folículos capilares na nuca. A saliva pode ser testada por isolamento viral ou transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Soro e fluido espinhal são testados para anticorpos contra o vírus da raiva e os fragmentos de pele são examinados para antígeno nos nervos cutâneos na base dos folículos capilares.

3.2.3 Diretrizes de órgãos, institutos, laboratórios e outras instâncias de importância nacional

O Instituto Pasteur de São Paulo – laboratório de referência nacional e principal consultor técnico do Ministério da Saúde para o diagnóstico de raiva – recomenda a utilização do Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT), classificando-a como um teste tão sensível quanto o MIT, mais econômico e capaz de fornecer resultados com maior rapidez. As vantagens do RTCIT em relação ao MIT já foram amplamente analisadas e corroboradas por diversos estudos multicêntricos há décadas. Uma recente análise técnica de imunofluorescência direta (DFA) para diagnóstico laboratorial da raiva no Instituto Pasteur de São Paulo, destaca que a DFA demonstrou ser uma ferramenta diagnóstica altamente eficaz e confiável para a detecção do antígeno do vírus da raiva, oferecendo resultados rápidos e precisos. Há evidências de que a DFA mantém uma alta sensibilidade e especificidade, mesmo em amostras desafiadoras, destacando sua importância no diagnóstico laboratorial da raiva. A confiabilidade da técnica é reforçada pela sua capacidade de adaptação a diversas condições de amostra, tornando-a uma metodologia de referência para a vigilância e controle da raiva.

O Laboratório Central (Lacen) do Paraná substituiu a Prova Biológica para o diagnóstico da raiva animal pela técnica QPCR desde 2019. Essa metodologia in vitro, que analisa o material genético do vírus diretamente do tecido, resultou em uma economia anual superior a R\$ 235 mil. Com a implementação dessa técnica, o Lacen conseguiu reduzir os custos em 60% e o tempo de processamento dos resultados de 26 para aproximadamente quatro dias, ampliando a capacidade de análise de 200 para cerca de 1800 amostras mensais. Este avanço contribui significativamente para a saúde pública, bem-estar animal e a segurança dos profissionais de saúde.

Tabela 2 Lista de Normas oficiais para o diagnóstico da raiva no Brasil

Documento	Origem	Ano
Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva	MS	2008
Manual Técnico do Instituto Pasteur - Número 8	Instituto Pasteur	2009
Controle da Raiva dos Controle da Raiva dos Herbívoros - Manual técnico 2009. (p.56)	MAPA	2009
Protocolo de tratamento da raiva humana no Brasil	MS	2011
Instrução Normativa Nº8	MAPA	2012
Informativo CRMV-PR no 004 - março/2020	CRMV PR	2020

Guia para diagnóstico laboratorial em saúde pública: orientações para o sistema nacional de laboratórios de saúde pública [recurso eletrônico]	MS	2021
Manual do e-Sisbravet versão2.2 (p.110)	MAPA	2021
Raiva - Página oficial do Governo Federal	MS	2022

3.2.4 Literatura científica

A partir de consulta às bases *PubMed*, *ScienceDirect* e *Google Scholar* e às páginas oficiais de instituições internacionalmente relevantes, foi levantada uma coleção de estudos e revisões na área de métodos diagnósticos, com foco na substituição do isolamento viral em camundongos para o diagnóstico da raiva e na avaliação e validação de técnicas biomoleculares e *in vitro* que representam avanços significativos na área de diagnóstico. Neste processo de análise sobre os métodos alternativos a inoculação viral em camundongos para o diagnóstico é fundamental não manter atenção ao fato de que a validação de técnicas como substitutas confiáveis ao isolamento viral em camundongos para o diagnóstico da raiva é uma área de pesquisa crítica, tendo implicações significativas para a saúde pública, bem-estar animal, e práticas de laboratório. Nesse sentido, o levantamento apresentado é uma ferramenta útil para investigação do estado atual da ciência neste campo específico, e, ao mesmo tempo uma ferramenta de apoio na promoção de mudanças regulatórias de ações que favoreçam a adoção de técnicas mais compatíveis com o desenvolvimento atual dos métodos de diagnóstico da raiva. Na tabela 2, a seguir estão expostos os títulos e suas respectivas origens e ano de publicação que constituem a coletânea de referências mencionadas.

Tabela 3 Publicações científicas importantes sobre diagnóstico laboratorial da raiva e Diretrizes oficiais globais

Título	Fonte	Ano
Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases	IAEA	1998
Diagnosis and Analysis of a Recent Case of Human Rabies in Canada	Canadian Journal of Infectious Diseases	2002
Clinical laboratory advances in the detection of rabies virus	Clínica Chimica Acta	2005
Comparative evaluation of commonly used laboratory tests for post-mortem diagnosis of rabies.	não consegui o artigo	2005
A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis	Microbiology and Immunology	2008
International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques and molecular biology techniques	Journal of Virological Methods	2011
The consistency approach for quality control of vaccines – A strategy to improve quality control and implement 3Rs	Biologicals	2011
The occurrence of rabies in pre-Columbian Central America: an historical search	Cambridge University Press	2011
Protocol for Postmortem Diagnosis of Rabies in Animals by Direct Fluorescent Antibody Testing. A Minimum Standard for Rabies Diagnosis in the United States	Centers for Disease Control and Prevention (CDC)	2011
How is rabies diagnosed?	(CDC)	2011
Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals	Indian Journal of Virology	2012
Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia	Virus Research	2012
Pathological, Immunological and Molecular Diagnosis of Rabies in Clinically Suspected Animals of Different Species Using Four Detection Techniques in Jordan	Transboundary and Emerging Diseases	2012
Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment	Virology Journal	2012
A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release	Vaccine	2013

As barreiras à substituição do uso de animais para o diagnóstico da raiva no Brasil.	Revista de Edu. Cont. em Med. Vet. e Zoot. do CRMV-SP	2013
Biotechnology advances: A perspective on the diagnosis and research of Rabies Virus	Biologicals	2013
Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances	The Scientific World Journal	2013
Recent Developments in the Diagnosis of Rabies in Humans and Animals	J. Vet. Pub. Hlth.	2013
Contributions to the implementation of validated alternative methods for rabies diagnosis	Tese (Doutorado) – UFPR	2014
Development and evaluation of a new immunohistochemistry-based test for the detection of rabies virus neutralizing antibodies	Human Vaccines & Immunotherapeutics	2014
Perceived Barriers to the Adoption of Alternatives to Laboratory Animal Use for Rabies Diagnosis	Alternatives to Laboratory Animals	2014
Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: A synopsis of drivers and barriers	Biologicals	2014
Comparative Costs of the Mouse Inoculation Test (MIT) and Virus Isolation in Cell Culture (VICC) for Use in Rabies Diagnosis in Brazil	ATLA	2015
Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies	African Health Sciences	2016
Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings	Int J Infect Dis	2016
The Use of a Decision Tree Based on the Rabies Diagnosis Scenario, to Assist the Implementation of Alternatives to Laboratory Animals	ATLA	2016
Validation of a Rapid Rabies Diagnostic Tool for Field Surveillance in Developing Countries	Plos neglected tropical deseases	2016
An inter-laboratory proficiency testing exercise for rabies diagnosis in Latin America and the Caribbean	PLOS Neglected Tropical Diseases	2017
Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus	Journal of Virological Methods	2017
Investigation of rabies virus glycoprotein carboxyl terminus as an in vitro predictive tool of neurovirulence. A 3R approach	Microbes and Infection	2017
Rabies—epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review	Veterinary Quaterly	2017
Additional Progress in the Development and Application of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis	Vet. Sci.	2018
Analysis of rabies diagnosis in dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil	Archiv für die gesamte Virusforschung	2018
Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Paraná, Brazil	Rev. Soc. Bras. Med. Trop.	2018
Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	2018
Laboratory techniques in rabies Fifth edition Volume 1	World Health Organization	2018
Rabies diagnosis and surveillance in animals in the era of rabies elimination	Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.	2018
Updates in rabies vaccine protocols and diagnostic techniques used globally and nationally	College of Veterinary Medicine/Kansas State University	2018

Rabies Control Manual - Georgia Department of Public Health	Georgia Department of Public Health	2018
Laboratory techniques in rabies Fifth edition Volume 2	World Health Organization	2019
Achieving scientific and regulatory success in implementing non-animal approaches to human and veterinary rabies vaccine testing: A NICEATM and IABS workshop report	Biologics	2019
Development and pre-validation of a quantitative multi-dose serological assay for potency testing of inactivated rabies vaccines for human use	Journal of Virological Methods	2019
Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines	Journal of Virological Methods	2019
Inactivated rabies vaccines: Standardization of an in vitro assay for residual viable virus detection	PLOS Neglected Tropical Diseases	2019
qPCR em substituição à Prova Biológica para o diagnóstico da raiva animal: uma contribuição à Saúde Pública, à Saúde do Trabalhador e ao Bem-estar Animal.	16ª ExpoEPI	2019
An inter-laboratory trial as a tool to increase rabies diagnostic capabilities of Sub-Saharan African Veterinary laboratories	PLOS Neglected Tropical Diseases	2020
Antemortem diagnosis of human rabies: A case report	Clinical Case Reports	2020
Comparison of five different laboratory techniques for the rabies diagnosis in clinically suspected cattle in Brazil	Journal of Virological Methods	2020
Detection of rabies virus antigen by the indirect rapid immunohistochemistry test in equines and comparisons with other diagnostic techniques	Zoonoses Public Health	2020
Evaluation of a rapid immunochromatographic test kit to the gold standard fluorescent antibody test for diagnosis of rabies in animals in Bhutan	BMC Veterinary Research	2020
Evaluation of polyclonal anti-RNP IgG antibody for rabies diagnosis by indirect rapid immunohistochemistry test	Acta Tropica	2020
Lacen/PR se torna o primeiro laboratório de saúde pública do Brasil a não usar animais de laboratório	Clínica Veterinária	2020
Multi-annual performance evaluation of laboratories in post-mortem diagnosis of animal rabies: Which techniques lead to the most reliable results in practice?	PLoS Negl Trop Dis	2021
A comparative study of direct fluorescent antibody, mouse inoculation, and tissue culture infection testing for rabies diagnoses	Journal of Virological Methods	2022
Alternative Methods to Current In Vivo Procedures to Address the 3Rs Tenet in Rabies Proficiency Testing	Viruses	2022
Análise critica da técnica de imunoflorescencia direta no diagnóstico laboratorial da raiva do Instituto Pasteur de SP, Brasil	Editora Científica Digital	2022
Development and validation of virus isolation for rabies diagnosis during outbreak in Sarawak.	Malaysian Journal of Veterinary Research,	2022
Laboratory validation of confirmatory tests for rabies diagnosis: Approaches to reduce animal use and facilitate sample collection	Transboundary and Emerging Diseases	2022
Use of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Diagnosis of Rabies Virus in Bats	zoonotic deseases	2022
An RT-rtPCR assay for detection of rabies virus in bovine specimens	Ciência Rural, Santa Maria	2023
Comparison of Rabies Cases Received by the Shomal Pasteur Institute in Northern Iran: A 2-Year Study	Global Health, Epidemiology and Genomics	2023

Diagnostic sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of rabies virus in domestic and wild animals in South Africa	Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	2023
Historical Laboratory Contributions Supporting Rabies Diagnosis and Disease Prevention and Control in the Americas	History of Rabies in the Americas: From the Pre-Columbian to the Present, Volume I	2023
Tracking lethal threat: in-depth review of rabies	Open Veterinary Journal	2023
Inovação e ética: a adoção de técnicas substitutivas ao uso de animais no diagnóstico laboratorial da raiva	Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Centro Biomédico: Instituto de Medicina Social Hesio Cordeiro.	2023
Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. Chapter 3.1.18. Rabies (Infection with rabies virus and other lyssaviruses)	World Organization for Animal Health (WOAH)	2023

4. Aptidão dos Métodos Alternativos ao MIT para o Reconhecimento pelo CONCEA

Avaliar a validação das técnicas DAF, DRIT, RT-PCR e RTCIT, como métodos substitutos para o diagnóstico da raiva sem o uso de animais, é crucial para avançar na ciência diagnóstica de maneira responsável e inovadora. A compilação de evidências que suportam a eficácia, sensibilidade, e especificidade desses métodos alternativos não só apoia a transição para práticas mais éticas, mas também pode contribuir para melhorar a precisão e rapidez do diagnóstico da raiva, uma questão de saúde pública global crítica.

A literatura científica oferece material suficiente para orientar decisões sobre elegibilidade de cada um dos métodos mencionados, incluindo estudos comparativos entre os métodos. Em consonância, as autoridades globais em saúde pública listam e recomendam os referidos métodos como ferramentas importantes nos planos de prevenção e erradicação da raiva.

Na avaliação comparativa entre o Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT), a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e o Isolamento Viral em Camundongos (MIT), o RTCIT e a PCR demonstram acurácia similar e superior ao MIT quanto a:

- **Tempo para resultados:** MIT requer de 7 a 30 dias; RTCIT, de 72 a 96 horas; PCR pode entregar resultados no mesmo dia;
- **Custo:** MIT é mais caro devido ao custo dos insumos e manutenção de camundongos. RTCIT e PCR têm custos reduzidos, parcialmente devido ao suporte do Ministério da Saúde com insumos pelo SIES, além de menores custos com gerenciamento de resíduos;
- **Implantação:** MIT exige maior complexidade estrutural e de treinamento do que RTCIT e PCR. Experiências no Lacen-PR indicam maior custo de implantação para MIT, confirmado por estudos;
- **Apoio para capacitação e insumos:** Ministério da Saúde, Instituto Pasteur e Lacen-PR oferecem suporte para RTCIT e PCR, incluindo parcerias e fornecimento de insumos;
- **Impacto na saúde mental dos trabalhadores:** O MIT, ao envolver uso e eutanásia de animais, implica estresse psicológico significativo para os profissionais, enquanto RTCIT e PCR, por serem métodos sem uso de animais, não apresentam este impacto;
- **Biossegurança:** MIT carrega riscos de biossegurança, incluindo riscos de contaminação por arranhões, mordidas, acidentes com perfurocortantes e exposição a aerossóis, que são minimizados ou ausentes em RTCIT e PCR.

Além do RTCIT, em 2019, a Organização Mundial de Saúde reconheceu a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como uma técnica primária para diagnóstico da Raiva. Isto representou um marco no diagnóstico da raiva nos laboratórios de Saúde Pública no Brasil. Nessa seara, a equipe do Laboratório Central do Estado do Paraná / Lacen-PR, validou a metodologia em que se realiza o teste de Imunofluorescência Direta (DFA) seguida da PCR em todas as amostras recebidas no estado, possibilitando que o Paraná se tornasse o primeiro estado do Brasil a não utilizar camundongos para o diagnóstico da raiva.

Recentemente, a WHOA fez uma atualização das diretrizes para o diagnóstico da raiva, com a publicação do Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition, 2023, capítulo 3.1.18 Rabies (Infection with rabies virus and other lyssaviruses). O manual traz uma análise comparativa entre os métodos e revela que o teste de inoculação em camundongos (MIT) é o menos recomendado em geral para os propósitos avaliados, recebendo o rótulo "não apropriado" para a maioria das aplicações, exceto para a confirmação de casos clínicos e vigilância da prevalência de infecção, onde recebe "+", indicando ser adequado em circunstâncias muito limitadas. Isso sugere que, comparado a outros métodos como DFA, dRIT, RT-PCR convencional e em tempo real, que receberam avaliações mais altas ("++" para recomendado), o MIT é considerado o menos eficaz e recomendável, de acordo com os critérios estabelecidos no documento. A tabela 3 resume características fundamentais sobre os métodos em termos de aptidão ao Reconhecimento por parte do CONCEA.

Tabela 4. Resumo do estado atual dos métodos candidatos ao reconhecimento

Método	Estado atual	Validação e Padronização	Sensibilidade e Especificidade	Acessibilidade e Custo
DFA	Ouro	Padrão Padronizado Internacionalmente	Excelente: ~100% com tecido fresco	Acessível Amplamente
RTCIT	Alternativa ao MIT	Padronizado pela OMS/CDC	Alta: comparável ao MIT	Limitado (requer cultivo celular)
RT-PCR	Alta sensibilidade	Padronizado pela OMS/CDC	Muito Alta	Limitada; requer

					laboratório especializado
DRIT	rápida	Alternativa	Protocolos desenvolvimento	em Alta, depende da integridade do tecido	Similar ao DFA, requer treinamento especializado

CONCLUSÃO

A literatura científica atualizada e os manuais de referência em saúde mundial, incluindo OMS por meio do manual da WOAH, sustentam, de modo convergente, a técnica de Imunofluorescência Direta (DFA) como atual padrão-ouro para o diagnóstico da raiva devido ao baixo custo, à rapidez de resultados e às taxas elevadas sensibilidade e especificidade. Contudo, devido ao risco de resultados falsos, os protocolos de diagnósticos da raiva devem englobar mais de uma técnica, para fins de confirmação dos resultados negativos. Os métodos sugeridos para utilização em conjunto com a IFD são o Teste Rápido de Imuno-histoquímica Direta (DIRT), Técnicas Moleculares com Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR) e o Teste de Infecção Celular do Vírus da Raiva (RTCIT). Estes testes são atualmente considerados seguros, confiáveis e preferíveis ao MIT. Existem outros protocolos em análise, porém ainda estão em etapa exploratória, ainda sem evidências conclusivas. Finalmente, o Isolamento Viral em Camundongos (MIT), embora seja uma opção para a confirmação do resultado negativo para a presença do vírus da raiva, é atualmente um método preterido em função dos conflitos bioéticos intrínsecos à técnica e da disponibilidade de alternativas diagnósticas mais adequadas. Em função da gravidade da raiva, o Isolamento Viral em Camundongo (Mice Inoculation Test - MIT) pode ser considerado em situações nas quais os resultados provenientes de três métodos alternativos, dentre os acima mencionados, empregando técnicas diferentes, se mostrem inconclusivos e a suspeita da doença se mantenha. Em resumo, considerando o estudo da arte em termos de técnicas laboratoriais para o diagnóstico da raiva, conclui-se que a realização do Isolamento Viral em Camundongos foi um método importante no passado, porém, atualmente, deve ser desencorajado em função dos conflitos bioéticos intrínsecos ao método e da disponibilidade de alternativas diagnósticas tecnicamente superiores. Contudo, embora existam métodos que se mostram mais vantajosos do que uso de camundongos para o diagnóstico da raiva, a substituição do método *in vivo* nos laboratórios brasileiros ainda é uma exceção. Segundo estudos da área, esta persistência no uso do método tradicional é motivada pela resistência às novas abordagens e pelo medo da inadequação regulatória. Além disso, a falta de conhecimento e clareza sobre o papel e importância dos métodos alternativos contribui para a hesitação dos laboratórios em arriscar uma mudança, evidenciando a importância de eliminar dúvidas para facilitar a transição para práticas diagnósticas mais éticas e eficientes.

Neste contexto, o Reconhecimento dos métodos alternativos ao teste de inoculação em camundongos para o diagnóstico da raiva, é essencial, especialmente à luz das recomendações da OMS, que enfatizam técnicas *in vitro* como RT-PCR para resultados rápidos e confiáveis, alinhando-se aos princípios de ética e bem-estar animal. Tal reconhecimento é crucial para incentivar laboratórios brasileiros, muitos dos quais ainda dependem do teste em camundongos como segunda prova, a adotarem essas alternativas. A adoção dessas práticas não só reflete um compromisso com a ética e a redução do sofrimento animal, mas também promove a modernização dos métodos diagnósticos no Brasil, garantindo precisão e eficácia alinhadas aos padrões internacionais.

Com base nas informações levantadas e considerações apresentadas neste parecer, a câmara permanente de métodos alternativos do CONCEA considera que as técnicas de diagnóstico da raiva DAF; DIRT; RT-PCR e RTCIT enquadram-se no conceito de método alternativo validado, estabelecido pela RN 54, estando, portanto, aptos à categoria de Métodos Reconhecidos pelo CONCEA, fazendo-se cumprir a legislação nacional e as diretrizes internacionais baseadas no princípio dos 3Rs.

REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS DO PARANÁ. Lacen é o primeiro laboratório livre de experimentação animal. Disponível em: <https://www.aen.pr.gov.br/Noticia/Lacen-e-o-primeiro-laboratorio-livre-de-experimentacao-animal>. Acesso em: 02 fev 2024.
2. ALVES, Nathália de Barros Salvino et al. Análise crítica da técnica de imunofluorescência direta no diagnóstico laboratorial da raiva do Instituto Pasteur de São Paulo. Open Science Research, [S.I.], v. 6, p. 383-396, 2022. ISBN 978-65-5360-212-0. Disponível em: www.editoracientifica.com.br
3. BONES, Vanessa; GAMEIRO, Augusto; MOLENTO, Carla. Comparative Costs of the Mouse Inoculation Test (MIT) and Virus Isolation in Cell Culture (VICC) for Use in Rabies Diagnosis in Brazil. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/026119291504300203>. Acesso em 22 set. 2022.
4. BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa nº 54, de 10 de janeiro de 2022. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Edição 11, p. 18, 17 jan. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-54-de-10-de-janeiro-de-2022-374148642>. Acesso em: 13 fev 2024.
5. CAPPELARI, S. E. M. et al. Laboratory validation of confirmatory tests for rabies diagnosis and the use of FTA® cards for sample collection. Transboundary and Emerging Diseases, 69(6):3449-3456, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36070102/>. Acesso em: 08 fev. 2024.
6. CORONA, Thaila Francini, et al. Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Paraná, Brazil. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Sj4TNKXtPp5fy8snKtpfVm/?lang=en>>. Acesso em 22 set. 2022.
7. CORONA, Thaila Francini, et al. Novel duplex RT-qPCR for animal rabies surveillance. Disponível em: <Novo duplex RT-qPCR para vigilância da raiva animal (wiley.com)>. Acesso em 22 set. 2022.
8. GIGANTE, Cristal, et al. Avaliação em vários locais do ensaio de RT-PCR em tempo real do pan-lyssavirus LN34 para diagnóstico de raiva post-mortem. Plos One. Helsinque. 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0197074>>. Acesso em 22 set. 2022.
9. KOTAIT, Ivanete. CARRIERI, Maria Luiza. TAKAOKA, Neide Yumie. Raiva – aspectos gerais e clínica. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1074599>>. Acesso em 22 set. 2022.
10. OMS (Organização Mundial da Saúde). Rabies: Zero deaths by 2030. Disponível em: <https://www.who.int/southeastasia/health-topics/rabies/rabies-zero-deaths-by-2030#:~:text=Once%20clinical%20symptoms%20appear%2C%20rabies,occurring%20in%20Africa%20and%20Asia>. Acesso em: 09/02/2024.

11. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Relatório final da III conferência nacional de saúde mental. Brasília, 2001. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=378%3Asaude-trabalhador&catid=990%3Abra-03-b-principal&Itemid=595. Acesso em 22 set. 2022.
12. RAIVA (infecção pelo vírus da raiva e outros lyssavírus): WOAH, 2023. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf. Acesso em: 13 fev 2024.
13. RUPPRECHT, C.E.; FOOKS, A.R.; ABELA-RIDDER, B. (Eds.). Laboratory Techniques in Rabies. 5th ed. Vol. 2. Geneva: World Health Organization, 2018. ISBN 978-92-4-151530-6.
14. UKAMAKA, E. U.; COETZER, A.; SCOTT, T. P.; ANENE, B. M.; EZEOKONKWO, R. C.; NWOSUH, C. I.; NEL, L. H.; SABETA, C. T. Economic and feasibility comparison of the dRIT and DFA for decentralized rabies diagnosis in resource-limited settings: The use of Nigerian dog meat markets as a case study. PLoS Negl Trop Dis, [s.l.], v. 14, n. 2, e0008088, 28 fev. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109246/>. Acesso em: 1 mar. 2024.
15. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Técnicas Laboratoriais em raiva. 5ª ed., vol. 1. Genebra, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310837/9789241515306-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 22 set. 2022.
16. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Técnicas Laboratoriais em raiva. 5ª ed., vol. 2. Genebra, 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310837/9789241515306-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 22 set. 2022.
17. World Organisation for Animal Health (WOAH). Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: WOAH Terrestrial Manual 2023: WOAH, 2023. cap. 3.1.18. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf. Acesso em: 13 fev. 2024.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnóstico de raiva em animais e humanos. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rabies/diagnosis/animals-humans.html>. Acesso em: 23/02/2024.

(assinado eletronicamente)

Acácio Duarte Pacheco

Coordenador da Câmara Permanente de Métodos Alternativos

(assinado eletronicamente)

Karynn Vieira Capilé

Membro da Câmara Permanente de Métodos Alternativos

(assinado eletronicamente)

Marco Antonio Stephano

Membro da Câmara Permanente de Métodos Alternativos

(assinado eletronicamente)

Silvia Stuchi Maria-Engler

Membro da Câmara Permanente de Métodos Alternativos

(assinado eletronicamente)

Cibelem Iribarrem Benites

Membro da Câmara Permanente de Métodos Alternativos



Documento assinado eletronicamente por **Cibelem Iribarrem Benites, Conselheiro Titular do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, em 20/03/2024, às 17:05 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Acacio Duarte Pacheco, Conselheiro Suplente do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, em 20/03/2024, às 17:13 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karynn Vieira Capilé, Conselheiro Titular do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, em 20/03/2024, às 17:14 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Stuchi Maria Engler, Conselheiro Suplente do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, em 09/05/2024, às 14:21 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Stephano, Conselheiro Titular do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, em 09/05/2024, às 14:53 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **11802823** e o código CRC **E72B8F17**.

