



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIEGO MAUÉS COSTA RIBEIRO**

**DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DAS DOENÇAS  
ACOMPANHADAS NA SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
DESENVOLVIMENTO RURAL DO DISTRITO FEDERAL- SEAGRI-  
DF E RESPECTIVOS PROGRAMAS**

**Monografia apresentada para a conclusão  
do Curso de Medicina Veterinária da  
Faculdade de Agronomia e Medicina  
Veterinária da Universidade de Brasília**

**Brasília DF**

**2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIEGO MAUÉS COSTA RIBEIRO**

**DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DAS DOENÇAS  
ACOMPANHADAS NA SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
DESENVOLVIMENTO RURAL DO DISTRITO FEDERAL- SEAGRI-  
DF E RESPECTIVOS PROGRAMAS**

**Orientadora**  
**Simone Perecmanis**

**Brasília DF**

**2013**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: RIBEIRO, Diego Maués Costa

**Título: DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS DAS DOENÇAS ACOMPANHADAS NA SECRETARIA DE AGRICULTURA E DESENVOLVIMENTO RURAL DO DISTRITO FEDERAL- SEAGRI-DF E RESPECTIVOS PROGRAMAS**

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Simone Perecmanis      Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovado      Assinatura: Simone Perecmanis

Prof. MSc. Hudson Holanda de Andrade      Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovado      Assinatura: Hudson Holanda de Andrade

MSc. Daniella Dianese Alves de Moraes      Instituição: SEAGRI/DF

Julgamento: Aprovado      Assinatura: Daniella Dianese Moraes

## DEDICATÓRIA

*Ainda que eu falasse a língua dos Homens e dos Anjos, ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça toda ciência, se não tiver amor, nada serei. E é com amor que dedico esse trabalho a minha família.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado essa família que sempre me apoiou em todos os momentos e ainda me apoia nessa nova fase da minha vida.

Agradeço aos meus pais João e Ivette por todo amor compreensão e apoio, momentos de discussão, mas também de respeito e orientação. Sem eles não chegaria até aqui.

Agradeço aos meus irmãos João, Regina, Zélia e Marcelina pelo apoio, carinho e amor.

Agradeço a minha mãe pelos momentos de brigas para fazer os deveres de casa e incentivos a continuar lutando e estudando.

Agradeço a meu pai pelos momentos na fazenda junto com a família.

Agradeço o pessoal do laboratório Vinicius, Gustavo, Marcela, Manu e Luciana pelo apoio.

Agradeço a minha orientadora Simone Peregmanis pela oportunidade de fazer o estágio na SEAGRI-DF, pelos ensinamentos que valem para a vida toda.

Agradeço o pessoal da SEAGRI-DF, Denise, Priscilla, Geraldo, Daniella, Buso, Natividade, Pablo, Marco, Janaína, Bernardo, Erica, Mariana, Renata, Raison, Vinicius, Diego, Anne Greice, Edvan, Lucílio e ao pessoal da vegetal por estarem sempre dispostos a me ajudar, pelas saídas, orientações e apoio.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio Raí, Rafael, Geisa, Vanessa, Juliana, Mariana pelas jogatinas de uno, pela pizza que chegou durante a aula de patologia. Ao Caju, Samara e Luiza por tentarem me embebedar com água. Foram momentos inesquecíveis.

## **RESUMO:**

O presente trabalho teve como objetivo descrever quais são os métodos de diagnósticos laboratoriais oficializados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) das doenças acompanhadas durante o período de Dezembro de 2012 a Fevereiro de 2013 na Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal (SEAGRI-DF) associado à Legislação vigente do Distrito Federal e do Ministério (MAPA) a partir da observação de casos de Anemia Infeciosa Equina, suspeita de Raiva, casos de Brucelose e Tuberculose. Além dos diagnósticos o presente trabalho descreve a importância do cadastro do produtor e o apoio do serviço de defesa que mantém um papel importante na vigilância sanitária realizando a fiscalização de vacinas e propriedades.

**Abstract:**

This study aimed to describe what are the methods of laboratory diagnostics officially announced by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of diseases accompanied during the period December 2012 to February 2013 the Department of Agriculture and Rural Development of the Federal District (SEAGRI-DF) associated with the current legislation of the Federal District and the Ministry from the observation of cases of Equine Infectious Anemia, suspected rabies, suspected of Classical Swine Fever, cases of Brucellosis and Tuberculosis. In addition to the diagnoses present work describes the importance of the producer registration and support of defense service that maintains an important role in conducting sanitary surveillance of vaccines and properties.

## **ANEXOS:**

Figuras 1 .....	72
Figuras 2 e 3 .....	73
Figuras 4, 5 e 6.....	74
Figuras 7 e 8.....	75
Figuras 9 e 10 .....	76
Figura 11 e 12.....	77
Figuras 13e 14.....	78
Figuras 15.....	79
Figuras 16 e 17.....	80
Figuras 18 e 19.....	81
Figuras20.....	82
Resenha .....	83

## Abreviações:

µl.....	Microlitro
2-ME .....	2-mercaptoetanol
AAT .....	Antígeno Acidificado Tamponado
AIE .....	Anemia Infecciosa Equina
C-ELISA .....	Teste de ensaio imunoenzimático complementar
DDA.....	Diretoria de Defesa Animal
DIDEV .....	Diretoria de Defesa e Vigilância Agropecuária
DIPOVA .....	Diretoria de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal e Animal.
DIVAL .....	Diretoria de vigilância Ambiental
DNA .....	Ácido desoxirribonucleico
ELISA .....	Teste de ensaio imunoenzimático
EPI .....	Equipamentos de proteção individual
FORM-IN .....	Formulário de investigação inicial
FORM-COM .....	Formulário de investigação complementar.
FITC .....	Fluoresceína de isotiocianato
FC .....	Fixação de complemento
FPA .....	Teste de Polarização de Fluorescência
GRSC .....	Granja de reprodutores suídeos certificado
GRH .....	Gânglio Trigêmeo, redes admiráveis, Hipófise.
IDGA .....	Imunodifusão em gel ágar.
I-ELISA .....	Teste de ensaio imunoenzimático indireto
IFA .....	Imunofluorescência Direta
Ig .....	Imunoglobulina

IgM.....	Imunoglobulina M
IgG.....	Imunoglobulina G
IN.....	Instrução Normativa
M.....	Mol
MAPA .....	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NBO.....	Núcleo de Base Operacional
NAA.....	Núcleo de Apreensão de Animais
nPCR.....	Nested PCR
OIE.....	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR.....	Reação em cadeia da Polimerase
pH.....	Potencial Hidrogeniônico
PNCEBT.....	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
PNSE.....	Programa Nacional de Sanidade Equídea
PNEFA.....	Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa.
RNA.....	Ácido Ribonucleico
RT-PCR.....	Reação em cadeia da polímerase com transcriptase reversa
SAL.....	Soroaglutinação lenta em tubo
SDA.....	Secretaria de Defesa Agropecuária
SEAGRI/DF.....	Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal
SLU.....	Serviço de Limpeza Urbana
SSA.....	Serviço de Sanidade Animal
TAL.....	Teste do Anel em Leite
UF.....	Unidade Federativa
UnB.....	Universidade de Brasília

VAIE..... Vírus da Anemia Infecciosa Equina

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15.
2.DEFINIÇÕES E HIERARQUIA DO MINISTÉRIO E DA SECRETARIA .....	16.
2.1.Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA).....	16.
2.2.Órgãos e Unidades descentralizadas.....	18.
2.3.Da gestão dos Laboratórios .....	19.
2.4.Laboratórios Credenciados no Distrito Federal.....	20.
2.5.Da Operacionalização e do Controle Laboratorial.....	20.
3.ANEMIA INFECCIOSA EQUINA .....	22.
3.1.Diagnóstico laboratorial.....	22.
3.2.Instrução Normativa No 45, de 15 de Junho de 2004.....	25.
4.ATIVIDADES DA SEAGRI/DF .....	27.
5.CADASTRO E FISCALIZAÇÃO DE VACINAS.....	29.
6.RAIVA.....	31.
6.1.Colheita do encéfalo.....	32.
6.2.Medidas de Vigilância Sanitária.....	33.
6.3.Preenchimento do FORM-COM.....	34.
6.4.Diagnósticos Laboratoriais.....	34.
6.5.Instrução Normativa No 5, de 1o de março de 2002.....	37.
6.6.Educação sanitária e divulgação preventiva.....	39.
7.BRUCELOSE.....	40.
7.1.Diagnóstico laboratorial.....	42.
7.2.Instrução Normativa No6, de 8 de Janeiro de 2004.....	55.
8.TUBERCULOSE.....	58.
8.1. Diagnóstico laboratorial.....	59.
8.2.Instrução Normativa N <sup>o</sup> 6, de 8 de Janeiro de 2004.....	59.
9.DISSCUSSÃO.....	67.
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68.
11.ANEXOS .....	.

11.1.Figuras.....	
11.2. Resenhas .....	83.

## 1.INTRODUÇÃO

A fiscalização agropecuária no Distrito Federal é realizada pela Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural (SEAGRI/DF) antiga Seapa, Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, fundada em 1964 (SEAGRI/DF, 2012).

Uma equipe de 250 fiscais, agrônomos, veterinários e engenheiros florestais, compõem a Subsecretaria de Defesa e Vigilância Agropecuária, subdividida na Diretoria de Defesa e Vigilância Agropecuária (DIDEV), Gerência de Defesa e sanidade animal, Gerência de defesa e sanidade vegetal e na Diretoria de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal e Animal (Dipova)(SEAGRI/DF, 2012).

A atuação desses profissionais garante a segurança alimentar e sanitária da população e dos animais por meio de fiscalização agropecuária e de inspeção de produtos de origem animal e vegetal. O papel da secretaria é contribuir para a sustentabilidade econômica, ambiental e social da área rural do Distrito Federal. A Defesa animal promove a segurança e vigilância sanitária animal no Distrito Federal preservando o patrimônio dos produtores rurais, os interesses econômicos do setor agropecuário e a saúde da população. A defesa vegetal é responsável pelo monitoramento e adoção das medidas de controle e erradicação de pragas das principais culturas do Distrito Federal. Fiscaliza o comércio e o uso de agrotóxicos e atua pela qualidade de sementes e mudas comercializadas(SEAGRI/DF, 2012).

O presente trabalho relata o acompanhamento das principais atividades da equipe de defesa animal, da Secretaria de Agricultura do Distrito Federal, realizado no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013 com ênfase nos diagnósticos oficiais preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e realizados pelos laboratórios oficiais e/ou credenciados das doenças que ocorreram ou foram suspeitadas neste período, com base na legislação federal e distrital. Além de outros serviços prestados à população como cadastramento de propriedades, controle de trânsito animal pela guia de trânsito animal, acompanhamento de vacinação, fiscalização e controle do comércio de vacinas das lojas agropecuárias (SEAGRI/DF, 2012).

## **2. Definições e hierarquia do ministério, da secretaria.**

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor.

Com a integração do desenvolvimento sustentável e da competitividade, o MAPA visa à garantia de segurança alimentar da população brasileira e a produção de excedentes para exportação, fortalecendo o setor produtivo nacional e favorecendo a inserção do Brasil no mercado internacional. Para a consecução de seus objetivos, o MAPA conta com uma estrutura fixa de cinco secretarias, 27 superintendências estaduais e suas respectivas unidades, uma rede de seis laboratórios.

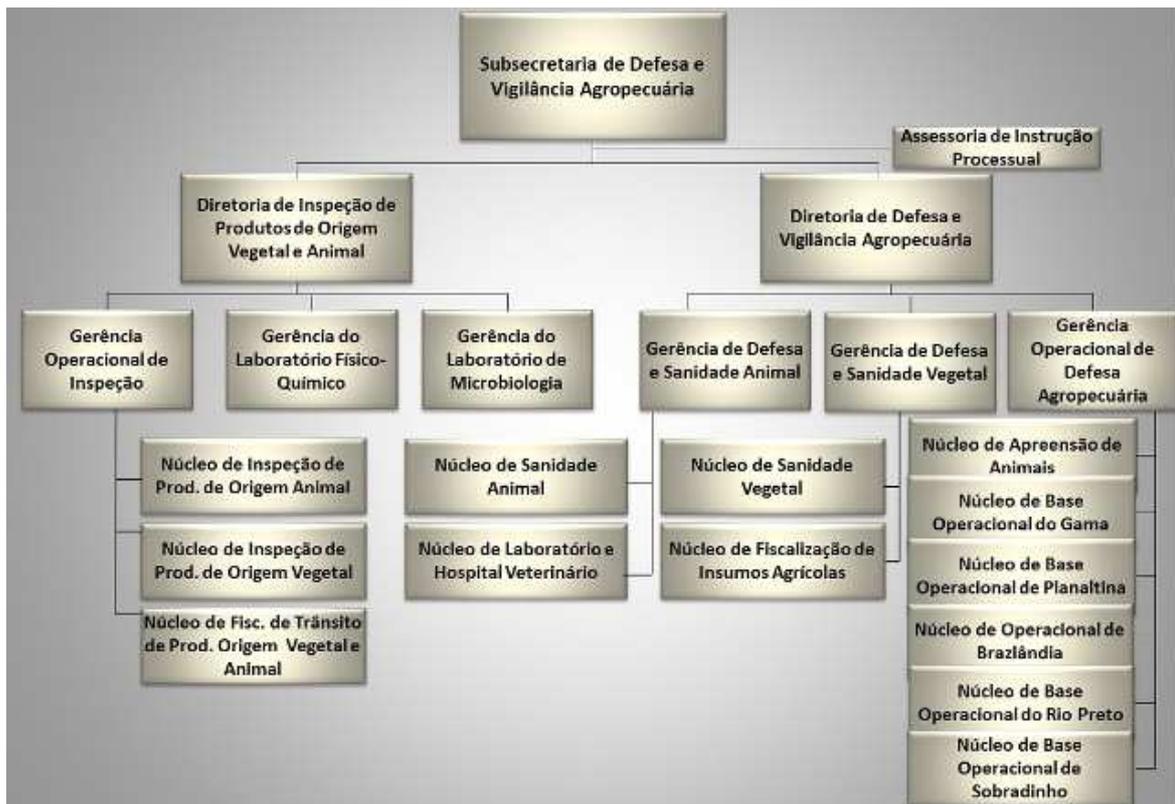
O ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento é organizado em secretárias, responsáveis pelos diferentes setores do agronegócio nacional (MAPA, 2012).

### **2.1. Subsecretaria de Defesa e Vigilância agropecuária**

A Secretaria de Defesa Agropecuária vinculada ao MAPA é responsável pela execução das ações de Estado para prevenção, controle e erradicação de doenças animais e de pragas vegetais. Visa assegurar a origem, a conformidade e a segurança dos produtos de origem animal e vegetal destinados à alimentação humana ou animal e também a idoneidade dos insumos em uso na agricultura e pecuária. Sua atuação é importante para a oferta de alimentos seguros, evitando possíveis riscos à saúde do consumidor e práticas desleais de comércio. A qualidade e a segurança dos produtos de origem animal e vegetal dependem do cumprimento de boas práticas de fabricação, da fiscalização oficial e da correta aplicação de normas e padrões técnicos estabelecidos.

No setor de produção animal, a secretaria responde pelas ações de vigilância sanitária e combate a doenças veterinárias. Inspecciona a industrialização de produtos de origem animal, a fabricação de medicamentos veterinários e a comercialização de sêmen para inseminação artificial de

animais domésticos (MAPA, 2012). Fiscaliza e classifica os produtos, subprodutos e resíduos animais de valor econômico. Na produção vegetal responde pela vigilância fitossanitária, inspeciona e fiscaliza a produção de sementes, mudas, fertilizantes, corretivo, inoculantes, estimulantes e biofertilizantes. Controla registro, classificação e fiscalização do comércio de bebidas e da produção de uvas, vinho e derivados. Inspeciona a utilização de agrotóxicos e seus componentes, além de fiscalizar e classificar os produtos, subprodutos e resíduos vegetais de valor econômico. Também é responsável por inspecionar atividades que envolvam organismos geneticamente modificados, controle de resíduos contaminantes e a fiscalização de importação e exportação de animais, vegetais, produtos e insumos agropecuários nos portos, aeroportos e fronteiras do país. Coordena ações de análise e diagnóstico de pragas e doenças e expede certificados sanitários e fitossanitários para exportação de produtos agropecuários e insumos. O organograma 1 à seguir expõe a hierarquia da Subsecretaria de defesa e vigilância sanitáriasubdividida na Diretoria de Defesa e Vigilância Agropecuária (DIDEV), Gerência de Defesa e Sanidade Animal, Gerência de Defesa e Sanidade Vegetal e na Diretoria de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal e Animal (Dipova) (SEAGRI/DF, 2012).



Organograma 1: Hierarquia da Subsecretaria de defesa e vigilância sanitária.

## 2.2. Órgãos e Unidades descentralizadas (MAPA, 2012):

Além das Secretarias, o MAPA possui uma rede de Superintendências Federais de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SFAs), órgãos de representação nos estados antes da Federação e conta com apoio dos Laboratórios Nacionais Agropecuários (Lanagros) responsáveis pelas análises laboratoriais relativas ao setor. Também são órgãos singulares do MAPA, o Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet) e a Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (Ceplac). Os órgãos colegiados atuam complementarmente em setores determinados do agronegócio. São o Conselho Nacional de Política Agrícola (CNP), Conselho Deliberativo da Política do Café (CDPC), Comissão Especial de Recursos (Cer) e a Comissão Coordenadora da Criação do Cavalo Nacional (CCCCN). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) são empresas públicas que atuam sobre ingerência e coordenação do Mapa. Também são entes descentralizados do ministério organizados sobre a forma de sociedades de economia mista, as Centrais de Abastecimento de Minas Gerais S.A (Ceasa/MG), a Companhia de Armazéns e Silos de Minas Gerais (Casemg) e a

Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (Ceagesp) (MAPA, 2012). A Secretaria de defesa agropecuária do serviço de Agricultura e Desenvolvimento Rural tem como apoio da rede nacional de laboratórios agropecuários do Sistema unificado de atenção à Sanidade Agropecuária (Suasa), coordenada pelo Ministério de Agricultura pecuária e Abastecimento, como instância Central e Superior (MAPA, 2012).

### **2.3. Da gestão dos Laboratórios**

As autoridades competentes, em cada instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, designarão os laboratórios credenciados para análise das amostras de controles oficiais, na forma definida pelo ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como Instância Central e Superior (MAPA, 2012).

Laboratórios Nacionais Agropecuários são os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012).

Os Laboratórios Nacionais Agropecuários e os laboratórios públicos e privados credenciados constituem a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, coordenada pelo ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como Instância Central e Superior (MAPA, 2012).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012), os Laboratórios serão organizados em rede, de forma hierarquizada e regionalizada, tendo como fundamento para a sua estruturação:

- O nível de complexidade de suas instalações laboratoriais.
- Os critérios epidemiológicos, sanitários, demográficos e geográficos que orientem a delimitação de suas bases territoriais;
- As atividades na sua respectiva jurisdição.

O credenciamento de laboratórios atenderá à demanda por análises ou exames, aos grupos de análises ou espécimes específicos, segundo critérios definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuários e Abastecimento, como Instância Central e Superior (MAPA, 2012).

Qualquer laboratório seja público ou privado, uma vez credenciado por

uma das três Instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, pode ser designado como referência, por um ou mais escopos, atendendo aos requisitos exigidos (MAPA, 2012).

A Instância Intermediária, ao designar um laboratório como referência, como escopo, para atuar na sua esfera de competência, empregará procedimento documento para verificar o cumprimento de critérios definidos por essa Instância, visando a reconhecer e a aceitar formalmente a competência analítica desse laboratório.

As Instâncias Intermediárias e locais podem estabelecer acordo de cooperação técnica com laboratórios de referência situados em outras Unidades da Federação (UFs).

Fica proibida a manipulação de qualquer organismo patogênico de alto risco sem existência de laboratório com nível de biossegurança adequado e sem prévia autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, como Instância Central e Superior (MAPA, 2012).

#### **2.4. Laboratórios credenciados no Distrito Federal**

- DiagnosticCentro de Diagnóstico Veterinário-Escopo: AIE, Mormo e Brucelose;
- Laboratório de virologia da UPIS - Escopo: AIE;
- Hospital Veterinário Dragões da Independência, Primeiro regimento de cavalarias de guardas – Escopo: AIE
- Santé Laboratório de Análises Clínicas – Escopo: AIE

Segundo o site do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012).

#### **2.5. Da Operacionalização e do Controle Laboratorial**

##### **Do controle Laboratorial**

Segundo o MAPA, os métodos de análise devem obedecer aos seguintes critérios:

- Exatidão;
- Aplicabilidade (matriz e gama de concentrações);

- Limite de detecção;
- Precisão;
- Recuperação;
- Seletividade;
- Sensibilidade;
- Linearidade;
- Incerteza das medições; e outros critérios que possam ser selecionados, consoante às necessidades.

A Diretoria de Defesa e Vigilância Agropecuária possui 3 subdivisões nas quais são: Gerência de Defesa e Sanidade Animal que cuida da vigilância e da sanidade animal, Gerência de Defesa e Sanidade Vegetal que cuida da vigilância e sanidade vegetal e Gerência Operacional de Defesa Agropecuária.

A Gerência Operacional de Defesa Agropecuária opera a logística e a operação das bases, barreiras e do núcleo de apreensão de animais.

#### **Núcleo de apreensão de animais (NAA)**

Segundo o regimento interno da SEAGRI/DF o Núcleo de Apreensão de animais é uma unidade orgânica de execução subordinada à Diretoria de Defesa e Vigilância Sanitária e possui essas tarefas:

- Supervisionar a apreensão de animais domésticos de grande e médio porte, soltos em áreas públicas, urbanas e rurais do Distrito Federal, que representem perigo ao trânsito ou diretamente à sociedade;
- Controlar e albergar animais apreendidos;
- Avaliar e propor a cobrança de taxas de indenizações das despesas efetuadas com os animais apreendidos.
- Avaliar a utilização, alienação ou doação dos animais apreendidos e não reclamados.
- Executar outras atividades na sua área de atuação e que lhes forem atribuídas.

Os animais apreendidos só serão liberados aos donos após pagamento de uma taxa devidamente estipulada e resultado do exame para A.I.E. negativo.

### **3. ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

A anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença viral persistente que acomete equinos, muaras e asinina (OIE, 2012).

Equídeos infectados com o vírus da AIE podem apresentar uma síndrome febril aguda, com trombocitopenia e/ou anemia, após um período de incubação de sete a 21 dias aproximadamente; a forma da doença pode ser aguda, subaguda ou crônica, perda de peso, edema ventral e anemia mais severa, porém a maioria dos animais infectados, aparecerem clinicamente normais com forma inaparente, dependendo da cepa do vírus se for de baixa ou alta virulência; quantidade de vírus recebida e da resposta individual do hospedeiro ao vírus (WEIBLEN; RIET-CORREA, 2007).

Uma vez infectados os cavalos permanecem portadores do vírus por toda a vida, e são grandes potenciais a transmitirem a doença para outros cavalos, já que a doença não tem cura, sejam por mosquitos hematófagos (mutucas), freios e esporas pontudas de uso compartilhado e outros fômites (EMBRAPA, 2006). Pode ser transmitido através da placenta, colostro e do acasalamento (THOMASSIAN, 2005). Potros de seis a oito meses de idade podem ser falsos-positivos devido transferência de anticorpos maternos a partir do colostro de mães infectadas.

#### **3.1. Diagnóstico Laboratorial**

O agente infeccioso da AIE é um vírus de RNA, *lentivírus* da família *Retroviridae* subfamília *Orthoretrovirinae* é o VAIE (OIE, 2012).

##### **Isolamento e identificação viral**

A identificação do VAIE pode ser feita através da inoculação do sangue de animais infectados em culturas de leucócitos preparados de animais livres da doença. A replicação viral nas culturas de leucócitos pode ser confirmada pela detecção do antígeno específico para VAIE através do teste de ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência, por técnicas moleculares ou pela inoculação em equídeos suscetíveis e observação dos sinais clínicos e

alteração hematológica. O isolamento do vírus só é positivo em soro (cultura de leucócito) se for confirmada a detecção de antígenos virais específicos para o VAIE pela imunofluorescência, reação em cadeia da polimerase (PCR), reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). Os métodos de isolamento e identificação do vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) são raramente utilizados como método de diagnóstico devido ao longo tempo, dificuldade de realização e altos custos com os procedimentos (OIE, 2012).

#### Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Momtaz, H. & S. Nejat, 2010; Fizeram estudos para a detecção de material genético amplificado a partir do sangue periférico de cavalos positivos e negativos para AIE utilizando o método nested PCR (nPCR) e obtiveram resultados que podem auxiliar no diagnóstico da AIE indicando ser um teste com maior sensibilidade e especificidade do que os testes sorológicos. (E.M. Santos et.al, 2011) fizeram um estudo comparando nested PCR com os testes sorológicos e também obtiveram resultados que mostraram o nPCR como um teste de diagnóstico complementar para AIE em amostras brasileiras. O método de nested PCR é baseado em sequências de iniciadores a partir da região gag do genoma proviral. O método pela PCR só pode ser utilizado quando há resultados nos testes sorológicos conflitantes, suspeita de infecção e resultado sorológico questionável, testes em potros possivelmente infectados porém é um teste mais caro e requer termocicladores disponíveis.

#### Testes sorológicos

O vírus da anemia infecciosa equina (VAIE) se mantém persistente no soro de animais infectados e por isso a detecção de anticorpos para antígenos do VAIE no soro confirma a infecção pelo lentivírus (OIE, 2012). Laboratorialmente o diagnóstico é realizado pela prova da imunodifusão em gel Ágar (IDGA ou teste de coggins) que é o diagnóstico definitivo e oficial aprovado pelo ministério (FLORES, 2007). A prova IDGA foi adaptada pelo doutor Leroy Coggins virologista da universidade de Cornell.

Em 1970 o teste se tornou o primeiro procedimento laboratorial acurado para a detecção do vírus. Em 1973 o teste IDGA ou teste de Coggins se tornou o teste oficial pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos. O método

é baseado na migração do antígeno comercial e dos anticorpos presentes no soro do animal, em um meio semisólido(ágar gel). O princípio da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é insolubilização e precipitação de complexos formados pela reação antígeno-anticorpo. Esses complexos podem ser visualizados sob a forma de linhas de precipitação no gel de agarose. O IDGA é um teste qualitativo simples, de baixo custo, possui boa sensibilidade e especificidade. Pela sua simplicidade e praticidade pode ser utilizado em qualquer laboratório. A prova detecta anticorpos precipitantes específicos entre 14 e 45 dias após a infecção (COGGINS et al., 1972). Apesar de ser considerado específico para o diagnóstico desta doença, o método não detecta anticorpos para VAIE nos estágios iniciais da infecção (SILVA, 2007). Segundo LANGEMEIER et al., 1996, há a possibilidade de reação cruzada com uma proteína da matriz de envelope de outros lentivírus. O teste de IDGA se baseia na detecção de anticorpos específicos para a proteína p26, um dos principais alvos da resposta imune porque quase todos os animais infectados produzem anticorpos específicos para a p26. (REIS, 1997). Essa técnica é utilizada para o diagnóstico sorológico de várias viroses, mas possui aplicação particular para o VAIE (teste de coggins), vírus da leucemia bovina, vírus da língua azul, doença de Gumboro e bronquite infecciosa aviária. As suas maiores restrições referem-se a problemas de sensibilidade por não detectar níveis baixos de anticorpos e detectar animais infectados no início da doença, especificidade (reações inespecíficas), repetibilidade e tempo para a obtenção dos resultados. Para a detecção dos animais soropositivos o teste recomendado pelo *world organization for Animal Health*, OIE (LEW et al., 1993; SOUTULLO et al., 2001) e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil é o IDGA ou teste de Coggins efetuado com antígeno registrado e aprovado pelo DDA para a AIE, ou outra prova reconhecida pelo MAPA, segundo a Instrução Normativa N°45, de 15 de Junho de 2004. Os testes de ensaio imunoenzimático(ELISA-*enzyme-linkedimmunosorbentassay*) são realizados em microplacas de poliestireno de 96 cavidades e utilizam anticorpos marcados com enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina). Permite detectar a maioria dos equídeos infectados com resultados negativos no IDGA(SILVA, 2007).

O Teste ELISA é considerado um método sensível para detectar anticorpos para o VAIE, possibilitando o teste de muitas

amostras ao mesmo tempo com resultados obtidos dentro de 4 a 5 horas (SILVA, 2007). A adaptação do teste ELISA para o uso como teste sorológico revolucionou o campo do diagnóstico e controle de infecções humanas e animais. No entanto a sua aplicabilidade e utilidade não são as mesmas para todos os vírus, principalmente por questões relacionadas à pureza do antígeno e ocorrência de reações inespecíficas (FLORES, 2007). Pode ser utilizada individualmente ou em rebanhos, constituindo-se em uma técnica de grande aplicação em estudos epidemiológicos e programas como o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE.

### **3.2.Instrução Normativa N°45, de 15 de Junho de 2004**

O Médico Veterinário requisitante do exame deverá estar inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária de sua respectiva Unidade Federativa, colher as amostras de sangue de todos os equídeos presentes na propriedade, efetuar a desora do coágulo e do soro, recolher somente o soro e encaminhar as amostras hermeticamente fechadas, identificadas e refrigeradas para os laboratórios credenciados no Distrito Federal. Para a coleta de amostras é de extrema importância a identificação do animal que se faz por meio da resenha. O resultado negativo deverá ser encaminhado para o médico veterinário requisitante ou ao proprietário do animal e terá um prazo de validade de 60 dias para propriedades sem controle.

Segundo o manual de legislação do MAPA, o resultado do exame laboratorial, quando positivo, deverá ser encaminhado, imediatamente ao SSA da DFA da UF de onde está o animal positivo para AIE. Os termos SSA e DFA, são termos antigos, porém como se trata de uma citação a legislação não se pode alterar.

É realizada a interdição da propriedade após a identificação do equídeo portador, lavrando o termo de interdição, notificação para o proprietário sobre a proibição de entrada e saída de equídeos de sua propriedade que agora é considerada um foco da AIE.

O Proprietário do animal deve ficar ciente do resultado do exame e pode requerer um pedido de contraprova solicitada ao SSA da DFA na respectiva UF no prazo máximo de oito dias, pois o animal tem até 30 dias para ser eutanasiado.

O reteste é o exame laboratorial para Diagnóstico da AIE, realizado a partir de uma nova colheita de material de animal com resultado positivo, para fins de confirmação do diagnóstico.

Deverá ser feita a eutanásia e/ou isolamento dos equídeos portadores na própria propriedade, mas caso não haja essa possibilidade, poderá ser tirada a guia de trânsito do animal e eutanásia no Hospital-Escola para Animais de Grande Porte da Universidade de Brasília a qual é uma particularidade do Distrito Federal. Deverá ser feita a coleta de sangue de todos os demais equídeos da propriedade durante a interdição para investigação epidemiológica.

A propriedade só será desinterditada após a realização de dois exames com resultados negativos consecutivos para AIE com intervalo de 30 dias nos demais equídeos remanescentes. Em locais onde há frigoríficos, abatedouros e exportação de carne podem ser realizados os abates sanitários dos animais positivos contanto que o abatedouro tenha o serviço de inspeção federal.

Foi realizado o acompanhamento de duas eutanásias de equinos positivos para AIE que deve ser rápido, indolor e sobre a responsabilidade do serviço veterinário oficial. Será lavrado termo de sacrifício sanitário assinado pelo médico veterinário oficial, pelo proprietário do animal ou seu representante legal como o caseiro e no mínimo uma testemunha. Não cabe indenização ao proprietário.

Havendo recusa do proprietário ou seu representante legal em assinar o termo de interdição ou do sacrifício do animal portador, será lavrado termo de ocorrência na presença de duas testemunhas, e requisitado apoio de força policial para o efetivo cumprimento da defesa sanitária, pois o proprietário passa a ser um infrator. Somente será permitido o trânsito interestadual dos equídeos quando acompanhados pela guia de trânsito e do resultado negativo do exame laboratorial para diagnóstico de AIE esta fiscalização é feita pelas barreiras que ficam em pontos estratégicos ou pelas barreiras móveis que utilizam veículos oficiais para deslocamento. A participação de equídeos em eventos agropecuários só será permitida com exame negativo para AIE válido durante todo o evento e vacinado contra influenza. Todo evento agropecuário devido à aglomeração de animais é um evento de alto risco e deve ser acompanhado pelo serviço de vigilância. Os equídeos filhos de mães positivas

deverão ser isolados por um período mínimo de 60 dias período este que será realizado dois testes de exames para AIE se confirmar dois testes consecutivamente negativos, os animais poderão ser reincorporados no rebanho.

Equídeos importados deverão apresentar exames negativos para AIE.

#### **4. Atividades da SEAGRI/DF**

Durante o período do mês de maio é obrigatória à vacinação de todo o rebanho bovino e de novembro a de até 24 meses no Distrito Federal. É de muita importância a campanha de vacinação, pois todo o rebanho brasileiro esta em risco se apenas um produtor deixar de vacinar. O Brasil, sob a coordenação do ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA) e com a participação dos serviços veterinários estaduais e do setor agroindustrial segue na luta contra a febre aftosa em busca de um país livre da doença. O programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA) tem como estratégia principal a implantação progressiva e manutenção de zonas livres da doença, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (MAPA, 2012). Com o intuito de realizar a vigilância sanitária o papel da secretaria de agricultura é de orientar o produtor quanto à importância da vacinação durante o período da campanha, atentar para os cuidados da vacinação, e riscos para o Brasil se houver algum caso de doença vesicular com suspeita de febre aftosa. Os maiores problemas para os núcleos de base operacionais (NBOs) são os produtores de baixa renda, assentamentos e até mesmo invasões com criação de gado. Segundo a SEAGRI/DF, são produtores que geralmente estão perto de córregos, lixões, e áreas ilegais com nenhum controle de bioseguridade. São considerados produtores de alto risco na lista logo abaixo:

- Propriedades localizadas na linha de fronteira internacional ou na linha de divisa com estados ou zonas de pior condição sanitária;
- Propriedades contíguas a locais onde ocorrem aglomerações de animais (inclusive aqueles utilizados para repouso de boiada em trânsito);
- Propriedades contíguas a abatedouros ou laticínios;

- Propriedades contíguas a aterros sanitários ou lixões;
- Propriedades contíguas a portos, postos de fronteira, aeroportos ou rodoviárias;
- Propriedades contíguas a laboratórios autorizados a manipular material infeccioso para febre aftosa;
- Propriedades com fluxo intenso de animais susceptíveis;
- Explorações pecuárias dentro de assentamentos rurais, aldeias indígenas ou qualquer outra situação na qual o sistema de produção pecuária necessite de atenção veterinária especial por parte do serviço oficial;
- Propriedades diferentes com explorações pecuárias pertencentes a mesmo proprietário, especialmente aquelas em outros países, estados e municípios de condição sanitária animal diferente;
- Propriedades localizadas à margem de estradas com grande fluxo de animais, principalmente estradas boiadeiras;
- Explorações pecuárias pertencentes a produtores que não declararam a vacinação contra a febre aftosa ou apresentam resistência em adotar as medidas sanitárias estabelecidas pelo serviço veterinário oficial, entre elas a declaração de movimentação dos animais; ou outra condição a ser especificada.

É importante o acompanhamento dessas regiões, pois muitos proprietários não declaram durante as etapas da campanha contra a febre aftosa a quantidade do rebanho, porém geralmente essas pessoas possuem apenas quatro a seis cabeças de gado o que torna ainda mais difícil a boa vontade do produtor em vacinar pequenas quantidades de animais. Para esses e outros produtores é aconselhável à vacinação assistida na qual o fiscal vai até a propriedade e acompanha a vacinação de todo o rebanho ou até 24 meses dependendo da etapa.

Após o período de vacinação o produtor tem até 30 dias para declarar a quantidade de gado junto com a nota de compra das vacinas de febre aftosa e raiva ou alegar que não há mais gado em sua propriedade o que leva a mesma a ser zerada pelo serviço da secretaria depois de ser feita a fiscalização in loco que é a vistoria da propriedade do produtor feita pelos fiscais que realiza a

análise de como estão os animais ou se não há nenhum animal.

Após esse período o serviço de defesa poderá notificar o produtor a comparecer no NBO mais próximo ou na sede para pagar uma multa a ser estipulada se for o caso deve-se marcar uma vacinação assistida se o produtor não vacinou o rebanho ou receber a declaração depois de pago à multa. A fiscalização in loco tem problemas como o contato com o proprietário e com a propriedade, muitas vezes é necessária a visita do fiscal na propriedade para ver se realmente tem ou não animais, contudo muitas vezes a propriedade está fechada e não há nenhuma lei que regule a entrada do fiscal na propriedade privada. Muitas vezes é deixado o termo de notificação sobre a não declaração do gado na porteira ou com um responsável legal como o caseiro que acaba por esquecer ou agir de má fé e não declarar a vacinação do rebanho o que atrapalha os serviços de fiscalização da sanidade animal. Muitos produtores alegam que não sabem da campanha ou que se esqueceram de declarar por isso é muito importante para os núcleos de bases operacionais e para a sede o acompanhamento dos produtores por meio do cadastro do produtor. Por meio do cadastro o fiscal sabe quem são os produtores inadimplentes que são aqueles que não declararam a quantidade e vacinação do rebanho após o período da campanha. Um dos problemas quanto aos produtores inadimplentes é que muitos alegam não ter conhecimento da importância da vacinação porém há muitos que sabem da importância, mas não vacinam o rebanho e preferem pagar a multa.

Cabe ao fiscal realizar o papel de educador sanitário no seu núcleo rural (SEAGRI/DF, 2012).

## **5. Cadastro e fiscalização de vacinas**

O cadastro é muito importante para o acompanhamento de produtores inadimplentes, para o acompanhamento do rebanho do produtor e o mais importante é auxiliar em um possível surto de alguma doença de notificação obrigatória. O trabalho de vigilância sanitária é baseado em estatísticas e trabalhos científicos, em algum caso de surto é necessário medidas de controle da doença com planos de contingência e o serviço de vigilância deve estar preparado para o controle do foco, saber quantas propriedades existem ao redor do foco e quais medidas sociais e de ação deverão ser tomadas. O cadastro de

propriedades é feito pelo sistema *sidagro* da secretaria e com o uso do mapa do *Google earth*<sup>®</sup> posicionamento. É muito importante o treinamento da equipe de profissionais técnicos e analistas para um trabalho mais eficiente e planejado. Cada NBO e a sede têm as suas metas e planejamentos para 2013. Durante o período da campanha de vacinação contra febre aftosa é importante o acompanhamento das condições das vacinas estocadas nas lojas comerciais e um dos papéis da secretaria é a orientação e fiscalização dos lotes de vacinas vivas atenuadas que devem ser estocadas na temperatura entre 2 a 8°C.

É

observada a temperatura atual, a mínima e a máxima, observada as condições das vacinas no estoque e recebido o controle de quantas vacinas são vendidas. É proibido o estoque de alimentos, bebidas dentro da geladeira junto com as vacinas e por isso deve-se abrir a geladeira para observar as condições do estoque.

O sensor de temperatura deve estar em um frasco similar ao frasco da vacina com água na mesma temperatura resfriada no meio da geladeira.

A vistoria nas lojas é feita duas vezes por semana durante a campanha de vacinação e uma vez por semana fora da campanha.

#### Formulários

O funcionário geralmente um técnico veterinário recebe um termo de vistoria com orientações sobre o condicionamento da vacina e como uma forma de controle para o MAPA. As bases e a sede recebem notificações de produtores em casos de suspeitas de raiva. O equídeo e/ou bovino morto deve ser avaliado e feita a coleta de encéfalo e encaminhado para a Diretoria de vigilância ambiental (DIVAL). O veterinário oficial deve se dirigir à propriedade para avaliar o estado clínico do animal, fazer levantamento da evolução clínica do caso, pesquisar histórico de casos na propriedade (antigos e recentes), e de espoliação por morcegos hematófagos. Cabe lembrar que todo profissional deve estar devidamente imunizado contra Raiva para atuar na investigação de Síndromes nervosas. Deverá ser preenchido o Formulário de Investigação Inicial (Form-In) na primeira visita e nas visitas posteriores, ser preenchido o Formulário de Investigação complementar (Form-Com) onde deve se encerrar o caso.

Se for fundamentada ou não, a suspeita deve ser registrada neste formulário. Se a suspeita não for procedente, deve-se encerrar o caso no próprio Form-In após a visita à propriedade, mas deve-se colher o encéfalo mesmo assim. Caso a suspeita seja fundamentada, deve-se orientar o proprietário, por escrito, em Termo de Visita, quanto aos cuidados necessários no contato com o animal fornecer água, alimentação, medicação durante a observação. É necessário que haja contato diário com o produtor ou responsável pelo animal, evitar que crianças cheguem perto do animal, Acompanhar a evolução do quadro clínico. A sede é informada pelas Bases(NBOs) sobre casos suspeitos, após a visita à propriedade.

## **6.RAIVA**

A Raiva pode causar lesões difusas no SNC, incluído medula, tronco encefálico, cerebelo e cérebro, apresenta uma grande variação de sinais clínicos devido a essa diversidade diz-se que a raiva pode cursar com uma forma furiosa e outra paralítica (RIET-CORREA, 2007).

A evolução da raiva é progressiva, levando o animal a óbito, normalmente, em 3 a 7 dias, contados a partir da aparição dos sintomas iniciais que são nos herbívoros paresia flácida e ocasionalmente hipoestesia, dos membros posteriores, evoluindo para os membros torácicos depois, decúbito, primeiro esternal e posteriormente lateral (RIET-CORREA, 2007). Pode observar-se paresia ou paralisia da cauda e diminuição do reflexo anal, flacidez da língua ou da mandíbula, estrabismo, nistagmo, dificuldade de deglutição, diminuição da sensibilidade facial, paralisia do maxilar, trismo mandibular ou diminuição dos reflexos palpebral e pupilar (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). É importante que o animal seja observado durante esse período a fim de se estabelecer um prognóstico do caso. Para os animais que apresentarem melhora, deve ser indicada avaliação por clínico veterinário, e tratamento apropriado, conforme o caso. Os animais que apresentarem decúbito prolongado, por mais de três dias consecutivos, e sem sinal de melhora, deverão ser avaliados por veterinário oficial que, se necessário, providenciará a eutanásia e colheita do material. Se o animal morrer, é importante que o veterinário oficial seja informado prontamente, e que este se dirija imediatamente à propriedade para a colheita do encéfalo. O tempo entre a

morte do animal e a colheita deve ser o menor possível visto que o encéfalo entra em autólise e pode ser feito o diagnóstico em até 15 dias.

### **6.1.COLHEITA DO ENCÉFALO (SEAGRI/DF, 2012)**

Para se proceder à colheita do encéfalo para diagnóstico, são necessários os seguintes equipamentos de proteção individual (EPIs):

- Luvas de látex descartáveis
- Óculos de proteção
- Máscara descartável
- Botas de Borracha
- Macacão

Equipamentos para colheita do material:

- Facas e Chaira
- Tesoura cirúrgica
- Pinça cirúrgica tipo “dente de rato”
- Machadinha
- Caixa Isotérmica e gelo reciclável
- Detergente e esponja de limpeza

Segundo o manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a retirada do encéfalo deve ser realizada assim: Desarticulação com o uso da faca, a articulação atlanto-occipital, removendo a cabeça do animal. Dessecação da pele e dos músculos da cabeça para expor a caixa craniana. Com a machadinha, golpear o crânio. Retire a dura-máter com auxílio de tesoura e pinça. Com o encéfalo exposto, seccione os nervos cranianos. Remova o encéfalo. Faça a inspeção visual quanto a coloração, formato e consistência. Do assoalho da cavidade craniana, deve-se ser coletado o monobloco que contém o Gânglio do nervo Trigêmeo, a Rede Admirável carotídea (vasos) e a Hipófise (GRH). De acordo com o Procedimento operacional padrão da SEAGRI/DF, 2012 Deve-se colocar o encéfalo e o monobloco “GRH” em saco Plástico limpo, evitando

derramamento de sangue e o contato deste com outras superfícies. Se possível, utilize dois sacos plásticos. Acondicionar o material na caixa isotérmica, utilizando o gelo reciclável para resfriamento da amostra. Encaminhar o material à sede, para que regiões específicas sejam seccionadas e enviadas para análise laboratorial.

O material deve estar acompanhado do formulário Form-In devidamente preenchido. Os encéfalos em processo de autólise podem ser coletados a critério do médico veterinário. Para o transporte até a sede, o encéfalo não pode ser acondicionado em álcool, formol ou outras soluções, nem permanecer em temperatura ambiente ou ser congelado, pois deve ser feita exames histopatológicos e imunoistoquímicos para possível encefalopatia espongiforme transmissível (EET) um dos diagnósticos diferenciais da Raiva. (De Acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012); Sempre que houver mais de uma amostra, estas devem ser colocadas em sacos plásticos separados e estar devidamente identificadas. Após o procedimento, o proprietário deverá ser orientado quanto à destinação da carcaça, de acordo com as condições do local. Se possível contratar os serviços da SLU para remoção da carcaça dentro de zonas urbanas (SEAGRI/DF, 2012).

## **6.2. Medidas de Vigilância Sanitária (De Acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012)**

Para a vigilância epidemiológica da raiva, está estabelecido um sistema de informações, que compreende a notificação obrigatória de casos e informes contínuos.

As Coordenações Estaduais do Programa de Controle da Raiva dos Herbívoros deverão manter um diagnóstico atualizado da situação epidemiológica, avaliando a distribuição e os fatores condicionantes de propagação, de maneira a permitir a adoção imediata de medidas de controle / profilaxia da raiva.

Devem ser avaliados os critérios que definam a prioridade de atendimento das notificações, como número de animais suspeitos de estar acometidos pela raiva, números de animais espoliados por *Desmodus rotundus*

e número médio de espólios em um único animal. As estratégias de vigilância epidemiológica e o plano de trabalho adotado devem ser revisados anualmente ou sempre que necessário (De acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012).

### **6.3. Preenchimento do FORM-COM (SEAGRI/DF, 2012)**

O FORM-IN é o Formulário de Investigação de Doença Inicial, deverá ser preenchido pelo veterinário oficial, sempre que houver suspeitas de animais com sintomatologia de alguma doença de notificação obrigatória. A numeração do FORM-IN deve ser transcrita na própria NBO, com número obtido junto ao Núcleo de Epidemiologia e Trânsito. Devem ser observados todos os campos do formulário, para que haja o maior número possível de informações que permitam a investigação epidemiológica do caso, inclusive coordenadas geográficas. O formulário deve ser encaminhado à sede, juntamente com a amostra coletada, se for o caso. Demais visitas a propriedade com suspeita de raiva deve-se abrir o Formulário de Investigação complementar FORM-COM.

### **6.4. Diagnósticos Laboratoriais**

Após o recebimento do encéfalo na Sede, serão realizadas seções específicas para encaminhamento aos laboratórios responsáveis pelos diagnósticos, como aqui no Distrito Federal a DIVAL é bem perto da Sede fica mais fácil enviar para DIVAL que realiza os testes laboratoriais necessários para identificação do vírus da raiva (De acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012).

O suporte laboratorial é muito importante para sinais clínicos neurológicos, pois existe uma gama de doenças que podem causar sinais neurológicos em bovídeos e equídeos. A doença da raiva era apenas reconhecida pela presença de corpúsculos de Negri a partir da coloração usando hematoxilina e eosina, mas o sacrifício dos animais abrevia o curso da doença, impedindo o desenvolvimento dos corpúsculos de Negri à deterioração do cadáver faz com que eles desapareçam até 6 horas após a morte do animal. Os corpúsculos de Negri se coram de magenta com pequenos pontos azul-

escuras no seu interior. Atualmente, há duas formas adequadas de diagnóstico da raiva são a imunofluorescência e a inoculação intracerebral em camundongos neonatos (Prova biológica) que são realizadas na DIVAL (De Acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012).

Material enviado:

- Fração cranial de um dos hemisférios do córtex cerebral
- Fração do córtex do cerebelo
- Fração de medula cervical
- Fração do tálamo

Estas frações serão coletadas em duplicata (Prova e contraprova). A prova será encaminhada para o laboratório, e a contraprova ficará armazenada, congelada até o resultado final dos exames (De Acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012). As técnicas de Histopatologia e a Imunohistoquímica são realizadas para diagnóstico das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis e só podem ser realizados em laboratórios credenciados pelo MAPA, os Lanagros. O material enviado são as demais seções e monobloco "GRH" em formol além da região do óxex, no tronco encefálico (De Acordo com o POP SEAGRI/DF, 2012).

Imunofluorescência

O teste mais utilizado na detecção do antígeno do vírus da Raiva é a imunofluorescência direta (IFA), na qual é recomendado tanto pelo WHO quanto pela OIE (OIE, 2012). Esse teste pode ser utilizado diretamente em esfregaços, em provas biológicas ou em cultivos celulares que tenham um efeito citopático rápido. A IFA dá resultados confiáveis em amostras frescas dentro de algumas horas em mais de 95-99% dos casos. IFA é sensível, específico e barato. A sensibilidade do IFA depende da espécie e condições do encéfalo coletado e como foi coletado (o grau de autólise e de como o cérebro é amostrado). Para o diagnóstico da raiva direta, esfregaços preparados a partir de uma amostra composta de tecido cerebral, que inclui o tronco cerebral, são fixados em 100% de acetona fria de grau elevado durante pelo menos 20 minutos, secas no ar e, em seguida, coradas com uma gota de

conjugado específico por 30 minutos a 37 ° C. Conjugados Anti-rábicos fluorescentes estão comercialmente disponíveis, podem ser monoclonais (Mabs) ou policlonais específicos para o vírus inteiro ou apenas para os anticorpos do nucleocapsídeo viral conjugados com um fluoróforo como a fluoresceína de isotiocianato (FITC).

Embora seja mais utilizada para a detecção de antígenos, a IFA também tem sido utilizada com sucesso para a detecção de anticorpos contra vários vírus. O antígeno (proteínas purificadas ou células infectadas) é inicialmente, imobilizado sobre um suporte sólido (placa de poliestireno ou lâminas de microscopia). O soro-teste é incubado por um determinado período geralmente 30min a 1hr, seguido de lavagem para a remoção dos anticorpos não ligados e pela adição do anticorpo secundário marcado com fluoresceína de isotiocianato (FITC). O anticorpo secundário deve ser específico para a espécie animal do soro-teste.

A leitura do teste é realizada sobre microscopia de UV, na qual se observa a emissão de luz fluorescente quando há a presença de anticorpos específicos contra o antígeno imobilizado. É uma técnica rápida e de fácil execução, porém frequentemente resulta em resultados de difícil interpretação, pela ocorrência de reações inespecíficas. Já foi utilizada para a detecção de anticorpos contra vários vírus, porém, atualmente, tem a sua utilização restrita, principalmente pelo desenvolvimento de técnicas mais específicas e objetivas e que não resultam em reações inespecíficas.

Os conjugados de anticorpos fluorescentes podem acessíveis, mas deve ser totalmente validado quanto à especificidade e sensibilidade, antes da utilização, incluindo a sua capacidade para detectar lyssavírus diferentes da raiva. Métodos de imunoperoxidase podem ser utilizados como uma alternativa ao IFA com a mesma sensibilidade (Lemboet al., 2006), mas deve ser dada atenção ao risco de inespecíficos resultados falsos positivos.

### Prova Biológica

A inoculação intracerebral em camundongos neonatos é uma prova útil para o diagnóstico da raiva utilizada quando à imunofluorescência é negativa ou junta. Tem a desvantagem de retardar o diagnóstico por pelo menos 3 semanas, que é o tempo necessário para a observação dos animais (RIET-

CORREA, 2007). Utiliza de 3 a 10 camundongos (*Mus musculus*) de 3-4 semanas de idade com 12-14g de peso ou uma ninhada de 2 dias de idade, camundongos recém nascidos. São inoculados intracerebralmente por material cerebral homogeneizado, clarificado que inclui: (Córtex, corno de Amon, tálamos, medula oblonga) em uma solução isotônica, tamponada, contendo antibióticos (OIE, 2012). O IFA é usado para confirmar a presença do vírus da raiva nos camundongos infectados (QUINN, 2005)

### **6.5.Instrução Normativa Nº 5, de 1º de março de 2002**

O proprietário deverá notificar de imediato, ao Serviço Veterinário Oficial, a ocorrência ou a suspeita de casos de raiva, assim como a presença de animais atacados por morcegos hematófagos ou a existência de abrigos de tal espécie. O Serviço Veterinário Oficial deverá tomar as providências necessárias ao atendimento dos animais e à coleta de material para diagnóstico da raiva e de outras encefalites diferenciais. Os servidores que trabalham em laboratório ou em atividades de controle da doença devem estar protegidos mediante imunização preventiva como preconiza a OIE. O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros tem como objetivo baixar a prevalência da doença na população de herbívoros domésticos. A estratégia de atuação do Programa é baseada na adoção da vacinação dos herbívoros domésticos, do controle de transmissores e de outros procedimentos de defesa sanitária animal que visam à proteção da saúde pública e o desenvolvimento de fundamentos de ações futuras para o controle dessa enfermidade. Na profilaxia da raiva dos herbívoros, será utilizada vacina inativada mantida de 2º a 8º C, com validade de até 1 ano ou mais, na dosagem de 2 ml, administrada pelo proprietário, através da via subcutânea ou intramuscular. Sempre que exigido pelo Serviço Veterinário Oficial, o estabelecimento responsável pela comercialização da vacina fica obrigado a comunicar a compra, a venda e o estoque de vacina. Sempre que necessário, será procedida a coleta, para análise fiscal, de vacinas anti-rábicas, elaboradas no país ou importadas, onde quer que se encontrem, visando à avaliação da sua eficácia. Nas áreas de ocorrência de raiva, a vacinação será adotada sistematicamente, em bovídeos e eqüídeos com idade igual ou superior a 3 meses, sob a supervisão do médico veterinário.

## Coleta de Material e dos exames de laboratório

A coleta de material de animais suspeitos de raiva será orientada por médico veterinário e efetuada por este ou por auxiliar que tenha recebido treinamento adequado e que esteja devidamente imunizado. Do animal suspeito de raiva deverão ser coletadas amostras do sistema nervoso central após o óbito, ou quando sacrificado na fase adiantada da doença (fase paralítica) (IN5, 2002).

Ao laboratório deverão ser remetidas amostras do sistema nervoso central do animal suspeito, no caso de ruminantes, o encéfalo (córtex, cerebelo e tronco cerebral), no caso de equídeos deve ser coletado o encéfalo e a medula, bem como 10% (dez por cento) dos morcegos hematófagos capturados.

Morcegos capturados e destinados à pesquisa da presença de vírus da raiva deverão, quando possível, ter pelo menos 1ml de sangue coletado, para posterior encaminhamento de 0,2ml a 0,5ml de soro sanguíneo ao laboratório, juntamente com o espécime a ser pesquisado. Na impossibilidade do envio das amostras de soro, os morcegos deverão ser anestesiados com o auxílio de éter anestésico e sacrificados seguindo os procedimentos bioéticos recomendados. O exemplar inteiro deverá ser encaminhado, congelado ou resfriado, para o exame laboratorial. A amostra coletada deve ser acondicionada em frasco com tampa ou saco plástico duplo, hermeticamente fechado, identificada e colocada dentro de uma caixa isotérmica, que deverá conter gelo reciclável para manter a temperatura entre 2°C a 4°C.

A amostra destinada a exames histopatológicos diferenciais para outras encefalites deverá ser acondicionada em frasco com tampa ou saco plástico específico e fixada em formol a 10%.

Caso o período entre a colheita da amostra e o envio ao laboratório seja prolongado, recomenda-se o congelamento da amostra destinada ao diagnóstico de raiva, depois de separadas as partes destinadas ao diagnóstico diferencial. Não se podem congelar as amostras destinadas ao diagnóstico da encefalopatia espongiforme bovina (EEB). O Laboratório deverá ser previamente informado do envio e

horário de chegada da amostra, evitando-se enviar próximo ou durante o final de semana sem prévia comunicação.

Deverão ser coletadas e enviadas ao laboratório, para diagnóstico, amostras de todos os animais mortos com sintomas compatíveis com encefalites. Deve-se incorporar na vigilância outras doenças que apresentem sintomatologia nervosa como encefalopatia espongiforme bovina e paraplexia enzoótica dos ovinos (scrapie).

A amostra deve ser enviada e/ou entregue ao laboratório preferencialmente até 24 horas após a colheita, em caixa isotérmica perfeitamente vedada, com o símbolo de risco biológico e uma etiqueta com os dizeres: URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL. Sobre a tampa da caixa isotérmica, deverá ser afixado o Formulário Único de Requisição dos exames para Síndromes Neurológicas, com informações referentes ao caso, dentro de saco plástico.

#### **6.6. Educação sanitária e divulgação preventiva**

(De acordo como POP SEAGRI/DF, 2012), para o objetivo maior da educação sanitária na área animal é a promoção da saúde animal, humana e do meio ambiente, a partir da conscientização e do consequente comprometimento de todos os segmentos da cadeia produtiva e da sociedade em geral.

Para atingir este objetivo, no caso da raiva, deverão ser utilizadas técnicas, recursos e meios de comunicação, bem como ações educativas específicas, visando à participação efetiva do pecuarista em relação ao seu papel central na notificação imediata de toda e qualquer suspeita de raiva, além da notificação da ocorrência de animais agredidos por morcegos hematófagos e do conhecimento da existência de abrigos de morcegos. Deve-se também orientar o uso de pasta vampiricida nos animais espoliados.

Na busca de soluções para o efetivo controle da raiva dos herbívoros, a organização das diferentes representações sociais da comunidade, tais como associações de produtores, sindicatos rurais, cooperativas, sociedades rurais, organizações governamentais e não-governamentais, na forma de conselhos intermunicipais ou municipais de

sanidade animal, integrados a um conselho estadual, determina uma condição extremamente favorável para a articulação e a execução das medidas preconizadas de controle da doença. Recomenda-se que sejam envolvidos também os conselhos municipais de saúde e de desenvolvimento rural (De acordo com o POP, SEAGRI/DF, 2012).

As ações educativas dos profissionais envolvidos com o programa deverão incentivar a mudança de comportamento do pecuarista, para que passe a:

- Comunicar ao Serviço de Defesa Sanitária Animal mais próximo da sua propriedade sobre a suspeita de Raiva ou sobre a espoliação produzida por morcegos hematófagos em animais na sua propriedade ou região;
- Vacinar o rebanho, quando necessário;
- Aplicar substância vampiricida ao redor das lesões recentes nos herbívoros, provocadas por morcegos hematófagos;
- Comunicar a morte dos animais aos médicos veterinários dos serviços

## **7. Brucelose**

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias gram negativas aeróbias, imóveis e intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella* (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007). A brucelose bovina é causada por *Brucella abortus*, mas os bovinos também são susceptíveis à infecção por outras espécies como *Brucella melitensis*, *Brucella suis* e *Brucella canis* (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007).

A Bactéria penetra no organismo pelas mucosas oral, nasofaríngea, conjuntival ou genital ou pelo contato direto com a pele. Após penetração as brucelas são drenadas pelos linfonodos regionais. Após a fagocitose por macrófagos e células reticulares a degradação ocorre no interior dos fagolisossomos, provocando a liberação da endotoxina e de outros antígenos (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007).

As bactérias conseguem sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos e são transportadas pela corrente sanguínea o que causa uma bacteremia. Abortos podem ser encontrados em rebanhos com uma alta percentagem de vacas prenhes e geralmente ocorre após o quinto mês de gestação, mas as gestações subsequentes normalmente são levadas a termo e provavelmente o bezerro se infecta durante o parto. Vacas primíparas são mais susceptíveis ao aborto enquanto que vacas mais velha adquirem imunidade e podem transmitir a doença durante o parto ou apresentar sinais de retenção de placenta, períodos entre partos maiores e partos de bezerros com malformação (EMBRAPA, 2006).

Devido à gestação ocorre produção de hormônios, acredita-se que as *brucelas* sejam atraídas para os placentômeros pela produção de eritritol e lá se multiplicam o que causa uma placentite necrótica e endometrite ulcerativa diminuindo o aporte de oxigênio para o feto que morre e é abortado. Restos de placenta, sangue e conteúdo fetal no pasto são as principais fontes de infecção, pois a *brucela* consegue permanecer por meses no meio ambiente o que dificulta a erradicação de uma propriedade uma vez que ocorra a doença no rebanho (EMBRAPA, 2006).

Fêmeas não gestantes podem reter a bactéria nos gânglios linfáticos, baço e no fígado (EMBRAPA, 2006). Nos touros, as estruturas-alvo incluem vesícula seminal, ampolas, testículos e epidídimo (QUINN, 2005). Os machos infectados não devem ser usados como doadores de sêmen, pois na inseminação artificial o sêmen é colocado diretamente no útero onde existe uma baixa linha de células de defesa já na monta natural embora o touro possa transmitir de uma vaca para outra a infecção não é considerada uma via de transmissão importante, pois o sêmen é ejaculado na vagina onde tem proteção natural. Em rebanhos afetados, a brucelose pode resultar em diminuição da fertilidade, redução na produção de leite que também pode transmitir a bactéria, aborto em animais de reposição susceptíveis e degeneração testicular em touros acarretam perdas de produção e ganho para o produtor (QUINN, 2005).

### **7.1.Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico da brucelose pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos (PNCEBT, 2006).

### Métodos Diretos

Os métodos diretos incluem o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica, e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR). O isolamento e a identificação da *B. abortus* a partir de material de aborto (feto, conteúdo estomacal de feto, placenta) ou de secreções apresentam resultados muito bons se a colheita e o transporte da amostra forem bem realizados e se a amostra for processada em laboratórios capacitados e com experiência.

Entretanto, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam o exame.

A imunohistoquímica pode ser procedida em material de aborto após a fixação em formol e permite tanto a identificação do agente como a visualização de aspectos microscópicos do tecido examinado. A PCR detecta um segmento de DNA específico da *B. abortus* em material de aborto, em secreções e excreções. É uma técnica bastante sensível e específica, mas requer equipamentos sofisticados e pessoais treinados (PNCEBT, 2006).

### Métodos Indiretos ou Sorológicos

O conhecimento da dinâmica das imunoglobulinas nos diferentes estágios da resposta imune tem orientado o desenvolvimento de inúmeros testes sorológicos. Esses testes visam demonstrar a presença de anticorpos contra *Brucella* sp em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e sêmen. Um teste sorológico perfeito deveria detectar infecção nos estágios iniciais da doença, antes da ocorrência do aborto, e deveria discriminar anticorpos de vacinação e de infecção; da mesma maneira, não deveria apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas. Ainda não existe tal teste para o diagnóstico da brucelose. Acrescente-se que nenhuma doença conta com um recurso diagnóstico com esse desempenho. As reações falso-

positivas são decorrentes de dois fatores distintos. Primeiro, a reação pode ocorrer devido à presença de anticorpos não específicos presentes nas infecções por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp. Segundo, podem decorrer como resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada (QUINN, 2005).

A resposta sorológica à infecção por *Brucella* sp é influenciada por muitos fatores, os quais refletem no desempenho das diferentes provas sorológicas. Destacam-se, entre esses fatores, o longo e variável período de incubação da doença, durante o qual a sorologia pode ser negativa, a condição vacinal dos animais, a natureza do desafio, a variação individual de resposta à vacinação e à infecção e o estágio da gestação no momento da infecção. A melhor estratégia – que tem sido validada por vários países que conseguiram avanços significativos no combate à brucelose costuma ser a combinação de testes, utilizados em série. Essa estratégia tem como base a escolha de um teste de triagem de fácil execução, barato e de boa sensibilidade, seguido de um teste confirmatório, a ser realizado apenas nos soros que resultarem positivos no teste anterior, geralmente mais elaborado, porém com melhor especificidade que o teste de triagem. Esse teste confirmatório tem que ter também boa sensibilidade (PNCEBT, 2006).

A quantidade de testes indiretos disponíveis para o diagnóstico de brucelose é bastante ampla; cada país, segundo suas disponibilidades e características, deve escolher aqueles que melhor se adaptem à sua estratégia. Em geral, os testes sorológicos são classificados segundo o antígeno utilizado na reação. Nos testes de aglutinação (lenta, com antígeno acidificado, do anel em leite, de Coombs), de fixação do complemento ou imunofluorescência indireta, o antígeno é representado por células inteiras de *B. abortus* (PNCEBT, 2006).

Nos testes de imunodifusão em gel (dupla ou radial), Elisa (indireto e competitivo), hemólise indireta e Western blot, o antígeno é representado pelo lipopolissacarídeo da parede celular da *B. abortus* semipurificado (PNCEBT, 2006).

A escolha dos métodos sorológicos precisa levar em consideração o custo, o tamanho e as características da população sob vigilância, a situação

epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes, bem como a utilização de vacinas (PNCEBT, 2006).

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem e os dois últimos como confirmatórios. Células inteiras da amostra de *B. abortus* 1119-3 são utilizadas na preparação dos antígenos (PNCEBT, 2006).

Todos os abortos que ocorrem no final da gestação, a partir do quinto mês devem ser considerados suspeitos de bruceloses e devem ser investigados. O histórico do animal deve ajudar porém os sinais clínicos não são patognomônicos (MATHIAS; RIET-CORREA, 2007).

#### Identificação do agente

As espécies de *Brucella* são pequenas bactérias Gram-negativas (0,6 X 0,6 a 1,5 µm), cocobacilares e imóveis. Como não se descoram pelo ácido acético a 0,5% na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada (ZNM), são classificadas como ZNM-positivos. As espécies de *Brucella* são aeróbias, capnofílicas e catalase-positivas. São oxidase-positivas, com exceção de *B. ovis* e de *B. neotomae*. Todas as espécies de *Brucella* são urease-positivas, exceto *B. ovis*. Alguns biótipos de *B. abortus* e *B. ovis* requerem 5 a 10% de CO<sub>2</sub> para isolamento primário. Crescem bem em atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. Meios enriquecidos com sangue ou soro são requeridos para cultivo de *B. abortus* biótipo 2 e *B. ovis* (QUINN, 2005). De acordo com o manual do PNCEBT, 2006; o material ideal para o isolamento de *Brucella* sp é o proveniente do aborto:

#### Feto e anexos fetais

O feto pode ser enviado inteiro, acondicionado em sacos plásticos duplos à prova de vazamentos. Se for mediante necropsia efetuada no próprio estabelecimento, colhe-se líquido do abomaso, pulmão, linfonodo bronquial, baço, fígado e suabe retal. No caso de membranas fetais, escolher aqueles cotilédones que apresentem aspecto anormal, com perda da cor e do brilho característico; eles deverão ser cuidadosamente manipulados (usar luvas e

máscaras especiais com pelo menos 95% de eficiência) em função da alta concentração de bactérias presentes (PNCEBT, 2006).

#### Exsudato vaginal

A eliminação de *B. abortus* pode durar várias semanas após o parto ou o aborto. O exsudato vaginal deve ser colhido mediante o uso de suabes especiais ou pipetas de inseminação. Existem suabes comerciais com meio de transporte que mantém as bactérias viáveis por períodos mais prolongados (PNCEBT, 2006).

#### Leite

Antes da colheita, o úbere precisa ser cuidadosamente lavado e feito também a assepsia dos tetos. Colher em frascos esterilizados cerca de 20 mL de leite de cada teto, desprezando-se os primeiros jatos. Enviar o quanto antes ao laboratório sob-refrigeração (2° a 8°C) ou congelado (-20°C), caso permaneça mais de 12 horas em trânsito até o laboratório, para evitar a proliferação de contaminantes. Colher primeiro dos tetos que estão afastados do operador. Fazer a assepsia das mãos antes de realizar a colheita em outro animal (PNCEBT, 2006).

#### Animais necropsiados ou colheita em matadouro

Os materiais de escolha são aqueles do sistema retículoendotelial. Os linfonodos mais importantes são os supramamários, os parotídeos, os retrofaríngeos, os ilíacos internos e os préescapulares. Além deles, o baço, os cotilédones, o útero e o úbere são também importantes nas fêmeas. Nos machos, além dos linfonodos citados e do baço, são também importantes os testículos, a próstata, os epidídimos e as vesículas seminais (PNCEBT, 2006).

A colheita de sangue para a obtenção de soro com o qual serão realizados os testes para o diagnóstico da brucelose, além de ser mais simples,

oferece menos risco de contágio ao profissional, se comparada com a colheita de material para o exame bacteriológico (PNCEBT, 2006).

O material preferencialmente utilizado para colher a amostra deve ser constituído de tubos que contém vácuo (sem anticoagulante) e siliconizados, que facilitam a retração do coágulo, com agulhas individuais e descartáveis. Tubos e agulhas convencionais podem também ser utilizados; apresentam, porém, o inconveniente de necessitar de limpeza, de preparação e distribuição, além de acrescentarem risco biológico na manipulação. De acordo com o PNCEBT, 2006: As tarefas da colheita exigem o cumprimento de algumas normas, que podem ser assim resumidas:

- a amostra de sangue colhida deve cobrir no mínimo 50% da capacidade de um tubo de 10 mL;

- Para se obter um bom soro, os tubos com sangue devem ser mantidos à temperatura ambiente por, no mínimo, 2 ou 3 horas, ao abrigo da luz, até que ocorra a coagulação sangüínea. Após a separação do coágulo, transferir o soro para um frasco limpo e seco. Não usar frascos ou tubos úmidos, porque podem hemolisar o sangue; (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

- os frascos contendo o soro deverão ser enviados o quanto antes ao laboratório e em horário de recepção previamente estabelecido; evita-se, assim, a deterioração do material. Caso sejam enviados ao laboratório em algumas horas, deverão ser refrigerados, ou congelados; (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

- os tubos serão identificados de tal forma que o número corresponda ao especificado na folha de campo;

- nas folhas de campo constarão somente os dados estritamente necessários, tais como nome do proprietário, número de animais na propriedade, número total de amostras colhidas, espécie, sexo, situação relativa à vacinação (data da vacinação), e outros dados considerados de interesse diagnóstico.

O diagnóstico sorológico da brucelose bovina e bubalina será feito por médico veterinário habilitado, bem como por laboratórios credenciados.

Antígenos deverão ser utilizados somente aqueles aprovados e controlados pelo MAPA. Os antígenos deverão ser transportados e

conservados em temperatura de, no mínimo, +2°C e de, no máximo, +8°C, bem como protegidos da luz solar direta (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

### Identificação dos Animais

Os animais serão identificados individualmente, quer por tatuagem, quer por outra forma, inclusive pelo Registro Genealógico; poderão também ser identificados pelo método definido para o programa de rastreabilidade do MAPA.

Teste de soro aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou teste Rosa Bengala.

É preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É o teste de triagem do rebanho. A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. Nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, enquanto que, nessa prova, reagem somente os isotipos da classe IgG1. O pH acidificado da mistura soro-antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos (MANUAL DO PNECBT, 2006).

### Técnica

- Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura ambiente, por, pelo menos, 30 minutos. Caso os soros estejam congelados, o período de equilíbrio à temperatura ambiente deve ser maior. Homogeneizar os soros antes de realizar a prova.

- Preencher os protocolos de prova, identificando a localização de cada soro.
- Ao utilizar o micropipetador de 30  $\mu$ L ou a pipeta de Bang dotada de uma p era de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, dispensar 30  $\mu$ L (ou da marca de 0,04 até 0,01 na pipeta de Bang) de soro por área da placa; depositar essa quantidade sobre a placa de vidro, encostando-se a ela a ponta da pipeta em ângulo de 45 .
- Agitar suavemente o antígeno e colocar uma gota (30  $\mu$ L) ao lado do soro, sem ser nele misturado.
- Misturar, por meio de misturador simples ou múltiplo, o soro e o antígeno com movimentos circulares, de modo a obter um círculo aproximado de 2 cm.
- Agitar a placa com movimentos oscilatórios, numa freq ncia de, aproximadamente, 30 movimentos por minuto, de modo a permitir que a mistura soro-antígeno flua lentamente dentro de cada círculo; a placa deve ser agitada continuamente por 4 minutos.
- Colocar a placa na caixa de leitura com luz indireta e realizar a leitura.
- Anotar os resultados.
- Desconsiderar as reações de aglutinação que ocorrerem após os 4 minutos.

Interpretação dos resultados de acordo com o Manual do PNCEBT, 2006.

Presença de grumos – REAGENTE

Ausência de grumos – NÃO REAGENTE

Teste do Anel em Leite (TAL).

Foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Empregam-se mais comumente antígenos corados com hematoxilina, que dá a cor azul característica à reação positiva. Se existirem anticorpos no leite, eles se combinarão com as B. abortus do antígeno, formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva). Não havendo anticorpos presentes, o anel de creme terá a coloração branca, e a coluna de leite permanecerá azulada (reação negativa). É uma prova de grande valor não só para se detectar rebanhos infectados, como também para se monitorar rebanhos leiteiros livres de brucelose. Tal prova tem limitações, pois poderá apresentar resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mamites ou, ainda, de animais em início de lactação (colostro) (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

#### Técnica

- Equilibrar as amostras de leite e o antígeno à temperatura ambiente por, pelo menos, 60 minutos.
- Misturar bem as amostras de leite.
- Colocar 1 mL de leite em tubos 10 mm x 100 mm. A coluna de leite deve ter, no mínimo, 2 cm.
- Obs.: Em função do tamanho do rebanho, a quantidade de leite a ser utilizada no teste (empregando-se a mesma quantidade de antígeno, 30 µL) deve ser aumentada para 2 mL ou 3 mL, conforme as recomendações do item 8 das Precauções na execução do teste.
- Adicionar ao leite uma gota (30 µL) de antígeno.
- Tampar o tubo e misturar por inversão várias vezes.
- Deixar em repouso por 1 minuto e verificar se a mistura está homogênea. Não deve sobrar antígeno nas paredes do tubo.
- Incubar por 1 hora a 37°C.

- Proceder à leitura.
- Anotar os resultados.

#### Interpretação dos resultados

Anel de creme azul e coluna de leite branca ou azulada: REAGENTE

Anel de creme branco e coluna de leite azul: NÃO REAGENTE

#### Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)

É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos. Baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19.

Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais ser considerados infectados (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

#### Técnica

- Diluir o antígeno para soroaglutinação lenta em tubos 100 vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Concentração final 0,045.
- Diluir o antígeno para soroaglutinação lenta em tubos 50 vezes em solução salina a 0,85% sem adição de fenol. Concentração final 0,090%.
- Preparar solução de 2-ME a 0,1 M misturando-se 7,8 mL de 2-ME a 992,20 mL de solução salina a 0,85% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente.
- Para cada amostra de soro a testar, colocar, em uma estante, duas fileiras de quatro tubos.
- Identificar o primeiro tubo de cada fileira com o número correspondente ao soro a testar.
- A primeira fileira corresponde às quatro diluições do soro do teste de soro aglutinação lenta em tubos e deve ser marcada com uma letra T. A outra fileira, em que se fará o teste do 2-ME, deve ser marcada com a letra M.
- Com uma pipeta de Bang, dotada de uma pêra de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, carrega-se o soro até passar um pouco da graduação superior.
- Com um papel absorvente, limpa-se o extremo da pipeta; mantendo-se esta em posição vertical sobre a parede do tubo que contém a amostra, deixa-se escorrer o soro até que o fundo do menisco no interior da pipeta esteja nivelado com a sua graduação superior.
- Com a pipeta no fundo do primeiro tubo da primeira fileira, deixa-se fluir 0,08 mL de soro. No segundo tubo, deposita-se 0,04mL, no terceiro, 0,02 mL e no quarto, 0,01 mL.
- Repete-se o procedimento descrito para depositar as mesmas quantidades de soro na segunda fileira de tubos (série do 2-ME).
- Para todas as amostras de soro, repete-se o procedimento de forma similar, pipetando os soros para cada duas fileiras de tubos adequadamente identificados.

- Incluir os soros controle positivos com atividade aglutinante conhecida.
- Incluir o soro controle negativo no teste do 2-ME.
- Com o dispensador automático de 2 mL ou pipeta de 10mL, agregam-se a cada um dos quatro tubos das fileiras T, 2 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em salina fenicada (0,5% de fenol).
- Com o dispensador automático de 2 mL (regulado para 1 mL), ou pipeta de 10 mL, agrega-se 1 mL de solução de 2-ME 0,1 M (diluído em solução salina sem fenol) a cada um dos tubos das fileiras M.
- Mistura-se bem, agitando a estante.
- Deixar as estantes com as amostras em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- Após os 30 minutos, empregando-se outro dispensador automático, ou outra pipeta de 10ml, agrega-se a cada tubo da fileira M, 1 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09 % de células) em solução salina fisiológica (sem fenol). A concentração final do antígeno na solução será 0,045% e a do 2-ME será de 0,05M.
- Mistura-se bem, agitando a estante.
- Incubar a 37°C por 48 ± 3 horas.
- A leitura do teste é feita através de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma forte luz que atravesse os tubos. As fontes de luz estranhas devem ser reduzidas.
- As interpretações baseiam-se no grau de aglutinação do antígeno e na firmeza dos grumos, após agitação suave dos tubos.
- Anotar os resultados. Se houver interesse na determinação do título final de um soro, poderá ser empregado o método de diluições seriadas (dobradas) (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Teste de Soro aglutinação em Tubos (SAT)

Também chamada de prova lenta – porque a leitura dos resultados é feita em 48 horas –, é a prova sorológica mais antiga e ainda hoje bastante empregada. É utilizada em associação com o teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina. É uma prova padronizada frente a um soro padrão internacional, sendo o resultado expresso em unidades internacionais.

A prova permite identificar uma alta proporção de animais infectados, porém, costuma apresentar resultados falso-negativos, no caso de infecção crônica e, em algumas situações, podem aparecer títulos significativos em animais não infectados por *B. abortus* como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias. Em animais vacinados com B19 acima de 8 meses, uma proporção importante deles pode apresentar títulos de anticorpos para essa prova por um longo tempo, ou permanentemente.

#### Interpretação dos resultados

O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo (+), incompleto (I) ou negativo (–):

- Reação completa – é aquela em que o líquido da mistura soro-antígeno aparece translúcido e a agitação suave não rompe os grumos;
- Reação incompleta – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;
- Reação negativa – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

#### Fixação de Complemento (FC)

Este teste tem sido empregado em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la.

É o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais. Na brucelose bovina, apesar de a FC detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento.

Animais infectados permanecem positivos por períodos mais longos e com títulos de anticorpos fixadores de complemento mais elevados do que os detectados nas provas de aglutinação. Em animais vacinados acima de 8 meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente do que os aglutinantes.

É um teste trabalhoso e complexo, que exige pessoal treinado e laboratório bem equipado.

#### Teste de Elisa Indireto (I-Elisa)

Existem vários protocolos de I-Elisa que têm apresentado bons resultados. Emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado com a peroxidase. Agentes quelantes (EDTA/EGTA) são utilizados para minimizar reações não específicas. O teste possui alta sensibilidade; entretanto, sua especificidade assemelha-se àquela do AAT (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

#### Teste de Elisa Competitivo (C-Elisa)

Neste teste, utiliza-se também como antígeno imobilizado na fase sólida o lipopolissacarídeo (LPS) de *B. abortus*. No momento da prova, o soro a testar é misturado com um anticorpo monoclonal específico contra a cadeia "O" de *B. abortus*. Um conjugado peroxidase-anti-IgG é utilizado para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida do teste.

Quanto maior a quantidade de anticorpos anticadeia "O" de *Brucella* no soro testado, maior a competição com o anticorpo monoclonal específico e menor a quantidade de cor desenvolvida. Por comparação com um controle, é

possível determinar a quantidade relativa de anticorpos anti-Brucella no soro teste. É um teste muito sensível e específico, e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose, assim como a FC. Seu custo é elevado (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

#### Teste de Polarização de Fluorescência (FPA)

O antígeno utilizado no teste é preparado com o polissacarídeo O, também denominado cadeia "O", de *B. abortus*, conjugado com o isotiocianato de fluoresceína. A prova se fundamenta na comparação de velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação dos complexos anticorpo-antígeno conjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno conjugado isolado.

Determina-se a velocidade de rotação das moléculas com o auxílio de um equipamento de iluminação por luz polarizada. Por meio da utilização de controles e de soro pré-titulado, é possível calcular a quantidade de anticorpos presente no soro testado.

O teste é concluído em poucos minutos; pode ser realizado em soro e leite e tem-se mostrado muito promissor para o diagnóstico de brucelose também em outras espécies (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

#### **7.2. Instrução Normativa N°6, de 8 de Janeiro de 2004**

Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT).

É obrigatória a vacinação de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, na faixa etária de três a oito meses de idade.

A marcação das fêmeas vacinadas também é obrigatória, utilizando-se ferro candente, no lado esquerdo da cara, com um V. Podem ser exceções de marcação as fêmeas destinadas ao Registro Genealógico, quando devidamente identificadas, e as fêmeas identificadas individualmente por meio

de sistema aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A vacinação será efetuada sob a responsabilidade técnica de médico veterinário cadastrado na secretaria, utilizando dose única de vacina viva liofilizada, elaborada com amostra 19 de *Brucella abortus* (B19). Onde não houver médicos veterinários cadastrados ou em regiões onde eles não atenderem plenamente a demanda do PNCEBT, o serviço de defesa oficial poderá assumir a responsabilidade técnica ou mesmo a execução da vacinação. O cadastro de médicos veterinários será gratuito. É proibida a utilização da vacina B19 em machos de qualquer idade e em fêmeas com idade superior a 8 (oito) meses. É obrigatória a comprovação da vacinação das bezerras na unidade local do serviço de defesa oficial, no mínimo uma vez por semestre.

A comprovação da vacinação será feita por meio de atestado emitido por médico veterinário cadastrado, de acordo com normas e usando modelo a ser definido pelo Departamento de Defesa Animal. A vacinação de fêmeas com idade superior a oito meses poderá ser autorizada com imunógenos que não interferem nos testes de diagnóstico (RB51), nas condições definidas pelo Departamento de Defesa Animal (DDA).

Os antígenos a serem utilizados nos testes sorológicos para diagnóstico de brucelose serão o antígeno acidificado tamponado, o antígeno para soro aglutinação lento e o antígeno para o teste do anel em leite, produzido e controlado segundo normas aprovadas pelo Departamento de Defesa Animal.

Outros antígenos poderão ser utilizados para diagnóstico de brucelose, após aprovação e nas condições definidas pelo Departamento de Defesa Animal.

A distribuição de antígenos será controlada pelo serviço de defesa oficial, devendo os mesmos ser fornecidos somente a médicos veterinários habilitados, a laboratórios credenciados, a laboratórios oficiais credenciados e a instituições de ensino ou pesquisa. O médico veterinário habilitado responsável pela aquisição do antígeno deverá fornecer ao serviço de defesa oficial relatório de utilização do mesmo, segundo condições a serem definidas pelo Departamento de Defesa Animal. De acordo com a IN 59, de 24 de Agosto de 2004, médicos veterinários cadastrados serão autorizados a adquirir

antígeno para diagnóstico sorológico de brucelose, respeitando as condições estabelecidas pelo Departamento de Defesa Animal.

A realização de testes de diagnóstico indireto para brucelose deverá obedecer a este Regulamento e seguir recomendações complementares determinadas pelo Departamento de Defesa Animal de acordo com a IN 6, 2004.

Os testes sorológicos de diagnóstico para brucelose serão realizados em:

- Fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade;
- Fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a oito meses.
- Fêmeas submetidas a testes sorológicos de diagnóstico para brucelose no intervalo de 15 dias antes do parto até 15 dias após o parto deverão ser retestadas entre 30 a 60 dias após o parto.
- Excluem-se dos testes sorológicos de diagnóstico para brucelose os animais castrados.
- O teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) será utilizado como teste de rotina, de acordo com as seguintes condições e critérios:
- Ser realizado por médico veterinário habilitado, por laboratório credenciado, por laboratório oficial credenciado ou, até 31 de julho de 2005 (alterado pela Instrução Normativa nº 59, de 24/08/2004) por médico veterinário cadastrado;
- A presença de qualquer aglutinação classificará o animal como reagente ao teste;
- Animais não reagentes são considerados negativos;
- Animais reagentes poderão ser submetidos a teste confirmatório ou, a critério do médico veterinário habilitado, ser destinados ao sacrifício ou destruição.
- O teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) será utilizado como teste confirmatório, em animais reagentes ao teste do AAT, ser for

realizado por laboratório credenciado ou laboratório oficial credenciado.

De acordo com a IN 6, 2004; Animais reagentes inconclusivos poderão ser a critério do médico veterinário habilitado:

- Submetidos ao teste de fixação de complemento; ou retestados em um intervalo de 30 a 60 dias, usando o teste do 2-ME, sendo classificados como reagentes positivos se apresentarem, no teste, resultado positivo ou segundo resultado inconclusivo;
- Destinados ao sacrifício ou destruição.

O teste de Fixação de Complemento será utilizado como teste confirmatório, realizado e interpretado de acordo com recomendações do Departamento de Defesa Animal, e deverá ser:

- Realizado por laboratório oficial credenciado;
- Utilizado para o trânsito internacional de animais;
- Utilizado para teste de animais reagentes ao teste do AAT ou de animais que apresentaram resultado inconclusivo ao teste do 2ME.

De acordo com a IN 6, 2004; O Teste do Anel em Leite (“TAL”) poderá ser utilizado pelo serviço de defesa oficial, ou por médico veterinário habilitado, para monitoramento de estabelecimentos de criação certificados como livre de brucelose, ou para outros fins, segundo critérios estabelecidos pelo serviço de defesa oficial.

Considera-se o resultado do teste como positivo quando a intensidade da cor do anel for igual ou maior que a da coluna de leite.

Considera-se o resultado do teste como negativo quando a intensidade da cor do anel for menor que a da coluna de leite.

Em casos de positividade, os animais do estabelecimento de criação deverão ser submetidos a testes sorológicos individuais para diagnóstico de brucelose. Outros testes de diagnóstico para brucelose poderão ser utilizados para complementar ou substituir os testes oficiais após aprovação e nas condições estabelecidas pelo Departamento de Defesa Animal de acordo com a IN 6, 2004.

## 8. Tuberculose

A tuberculose é causada pela bactéria, baciloácido-resistentes, *Mycobacterium bovis* é uma zoonose de evolução crônica que acomete principalmente bovinos e bubalinos. É caracterizada-se pelo desenvolvimento progressivo de lesões nodulares denominadas tubérculos, que podem localizar-se em qualquer órgão ou tecido (QUINN, 2005).

Diversas espécies, incluindo o homem são sensíveis à infecção por *Mycobacterium bovis*. No entanto, os bovinos, caprinos e suínos são os mais susceptíveis. Em bovinos a via mais frequente de infecção é a respiratória, principalmente, em animais que permanecem estabulados. Em bezerros alimentados com leite proveniente de vacas com tuberculose ou em bovinos que bebem águas paradas contaminadas podem ocorrer infecções pela via digestiva (RIET, 2007). A pasteurização do leite tem eliminado a exposição de humanos à infecção viabilizada por produtos lácteos (QUINN, 2005). Nos estágios iniciais da doença, as lesões podem ser difíceis de detectar ao exame *post-mortem*. A principal fonte de infecção para o rebanho são animais infectados introduzidos no rebanho (EMBRAPA, 2000). No Brasil, a tuberculose continua sendo grave problema de saúde dos rebanhos leiteiros, que gera grandes prejuízos, em decorrência de descarte de animais, de queda na produtividade, de baixa qualidade do leite, de condenação de carcaças, e de gastos com serviços veterinários, medicamentos, etc (EMBRAPA, 2006).

### 8.1. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da tuberculose bovina pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico, que pode ser humoral

(produção de anticorpos circulantes) ou celular (mediada por linfócitos e macrófagos) (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

A tuberculinização é uma medida da imunidade celular contra *M. bovis* por uma reação de hipersensibilidade retardada (tipo IV). A reação tuberculínica, a bacteriologia e a histopatologiasão os métodos mais utilizados para o diagnóstico da tuberculose bovina e bubalina. A grande inespecificidade dos sinais clínicos, a dificuldade de isolamento do *M. bovis* do animal vivo e o baixo nível de anticorpos durante o período inicial de infecção faz com que os diagnósticos clínico, bacteriológico e sorológico tenham um valor relativo (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

O diagnóstico clínico, associado à tuberculinização, possibilita a identificação de animais com tuberculose avançada, os quais geralmente apresentam um decréscimo da sensibilização alérgica, podendo, por vezes, chegar à anergia. Pode-se afirmar que existem métodos diagnósticos adequados para o desenvolvimento de programas de controle e erradicação da tuberculose bovina; entretanto, não existe um método diagnóstico da tuberculose bovina que tenha uma eficácia absoluta. A prova tuberculínica, a vigilância epidemiológica em matadouros, os controles sanitários, o diagnóstico de laboratório, são todos elementos básicos que devem ser empregados com critério e de modo adequado a cada situação epidemiológica. Independentemente dos métodos de diagnóstico utilizados, é fundamental que os animais positivos sejam abatidos, evitando-se, assim, a disseminação da tuberculose (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

### Diagnóstico Bacteriológico

O diagnóstico definitivo da tuberculose é realizado mediante o isolamento e a identificação do agente por métodos bacteriológicos. Amostras frescas podem ser fixadas em lâmina e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen para a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR), contudo, a

sensibilidade do método é baixa, e um resultado positivo sugere fortemente tratar-se de micobactéria, mas não informa a espécie. Essa mesma coloração pode ser empregada para colônias isoladas em meios de cultura. Muitas características, inclusive a propriedade tintorial, superpõem-se nos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia*, tornando difícil, em alguns casos, a diferenciação entre ambos (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

O diagnóstico bacteriológico por isolamento requer um longoperíodo de incubação (30 a 90 dias), pois o *M. bovis* cresce lentamente em meios de cultura artificiais. Para permitir o isolamento de qualquer bactéria do gênero *Mycobacterium* sp, recomenda-se a semeadura concomitante nos meios de cultura Löwenstein-Jensen e Stonebrink-Lesslie (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

As análises bacteriológicas completas só serão necessárias nas seguintes situações:

- Confirmação da presença de infecção tuberculosa em bovinos de um país ou região onde não foi comprovada anteriormente;
- Estudo de animais positivos ao teste tuberculínico, nos quais não se observaram lesões macroscópicas sugestivas de tuberculose. Nesses casos, a pesquisa bacteriológica será feita especialmente em amostras de linfonodos do trato respiratório e intestinal;
- Confirmação da presença de infecção em animais positivos ao teste tuberculínico, com ou sem lesões macroscópicas, de uma propriedade considerada livre de tuberculose;
- Pesquisa de micobactérias em lesões sugestivas de tuberculose, encontradas durante a inspeção sanitária *post-mortem* de animais provenientes de unidades de criação monitoradas para tuberculose;
- Pesquisa de micobactérias em amostras de leite e de outros produtos de origem animal;

- Necropsias de animais com reações inespecíficas, nos quais são encontradas lesões sugestivas de tuberculose.

Nos últimos anos, os avanços da biologia molecular e a evolução dos conhecimentos sobre a imunidade contra as micobactérias levaram ao aparecimento de novos métodos diretos e indiretos para o diagnóstico da tuberculose bovina (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Dentro dos métodos indiretos surgiram novos testessorológicos, que visam detectar alterações dos componentes séricos na resposta à infecção pelo *M. bovis*, e métodos de avaliação *in vitro* da resposta imunológica celular contra o *M. bovis* (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

O desenvolvimento de um método para a detecção de interferon gama após estimulação do sangue total com derivativo de proteína purificada (PPD) mostrou-se muito útil e específico para detectar animais tuberculosos, e vem sendo empregado como teste complementar da tuberculinização em alguns países, como Austrália e Nova Zelândia (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Os métodos diretos passaram por uma verdadeira revolução em virtude do desenvolvimento do método molecular denominado reação da polimerase em cadeia (PCR), que tem como princípio básico a detecção de um fragmento de DNA específico do gênero ou então do complexo *M. tuberculosis*. Métodos de biologia molecular estão sendo desenvolvidos para detectar diretamente o agente em amostras clínicas, para identificar o agente isolado pelos métodos clássicos de bacteriologia e para avaliar a variação genética dentro de uma espécie de micobactéria (QUINN, 2005).

As técnicas moleculares já encontram alguma aplicação prática dentro dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina, sendo utilizadas de forma complementar aos procedimentos bacteriológicos clássicos (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

Quanto aos métodos indiretos, nenhum novo método apresentou desempenho que justificasse a substituição dos testes tuberculínicos padrões (MANUAL DO PNCEBT, 2006).

## **9.2.Instrução Normativa N°6, de 8 de Janeiro de 2004**

As Delegacias Federais de Agricultura em conjunto com os serviços de defesa sanitária animal dos Estados, habilitarão médicos veterinários que atuam no setor privado para realização de testes de diagnóstico e atuação no processo de certificação de propriedades, na respectiva Unidade da Federação. De acordo com a IN 6, 2004; O médico veterinário habilitado deverá:

- Estar em situação regular com o Conselho de Medicina Veterinária da(s) Unidade(s) Federativa(s) de atuação;
- Ter sido aprovado em Curso de Treinamento em Métodos de Diagnóstico e Controle da Brucelose e Tuberculose, reconhecido pelo Departamento de Defesa Animal;
- Cumprir este Regulamento e outras normas complementares estabelecidas pelo Departamento de Defesa Animal; possuir infraestrutura e material adequado à execução dos testes de diagnóstico para brucelose e tuberculose, conforme determinação do Departamento de Defesa Animal;
- Fornecer informações e apresentar relatórios de atividade, relacionados com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, na unidade local do serviço de defesa oficial, com periodicidade e em modelos estabelecidos pelo Departamento de Defesa Animal.
- A habilitação será suspensa pela Delegacia Federal de Agricultura em caso de descumprimento deste Regulamento ou de outras normas estabelecidas em legislação sanitária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Médicos veterinários oficiais deverão ser capacitados e aprovados em Curso de Treinamento em Métodos de Diagnóstico e Controle da Brucelose e Tuberculose, reconhecido pelo Departamento de Defesa Animal.

De acordo com a IN 6, 2004; O Credenciamento de Laboratórios para o Diagnóstico de Brucelose e de Tuberculose:

- O Departamento de Defesa Animal credenciará laboratórios privados, aos quais serão delegadas funções de diagnóstico para brucelose ou tuberculose, cabendo-lhe determinar quais os testes de diagnóstico que serão realizados nesses laboratórios e quais os requisitos necessários para obter o credenciamento.
- O Departamento de Defesa Animal credenciará laboratórios oficiais, aos quais serão delegadas funções de diagnóstico para brucelose ou tuberculose, cabendo-lhe determinar quais os testes de diagnóstico que serão realizados nesses laboratórios e quais os requisitos necessários para obter o credenciamento.

De acordo com a IN 6, 2004; O Departamento de Defesa Animal designará laboratórios de referência para brucelose e tuberculose que deverão:

- Ser responsáveis pela produção de antígenos de brucelose e tuberculinas de referência ou para utilização em programas ou em situações excepcionais de interesse do Departamento de Defesa Animal;
- Realizar técnicas diretas e indiretas de diagnóstico para brucelose e tuberculose em situações a serem definidas pelo Departamento de Defesa Animal;
- Efetuar o controle oficial das partidas de antígenos de brucelose e tuberculinas produzidas no país;
- Controlar a qualidade das vacinas comerciais contra a brucelose;
- Realizar o isolamento e a caracterização epidemiológica de amostras de campo em situações a serem definidas pelo Departamento de Defesa Animal; executar e colaborar em trabalhos de pesquisa e avaliar novos métodos de diagnóstico e novas vacinas.
- Os laboratórios de referência deverão fornecer amostras padrão para a produção de antígenos, alérgenos e imunógenos.

De acordo com a IN 6, 2004; Para fins de trânsito interestadual de machos e de fêmeas, das espécies bovina e bubalina, destinados à reprodução, é obrigatória a apresentação de resultados negativos aos testes de diagnóstico para brucelose e tuberculose, obedecendo ao que se segue:

- A emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) fica condicionada à apresentação dos atestados de exames negativos para brucelose e tuberculose, emitidos por médico veterinário habilitado ou, até 31 de julho de 2005 (alterado pela Instrução Normativa nº 59, de 24/08/2004) por médico veterinário cadastrado, os quais deverão permanecer anexados à via da GTA que acompanha os animais;
- Os testes de diagnóstico devem ter sido realizados por médico veterinário habilitado, por laboratório credenciado, por laboratório oficial credenciado ou, até 31 de julho de 2005 (alterado pela Instrução Normativa nº 59, de 24/08/2004) por médico veterinário cadastrado;
- Os atestados de exames negativos para brucelose e tuberculose serão válidos por 60 (sessenta) dias, a contar da data da colheita de sangue para diagnóstico de brucelose e da realização do teste para diagnóstico de tuberculose;
- Os testes de diagnóstico para brucelose são obrigatórios para os animais especificados anteriormente, excetuando-se os animais com origem em estabelecimento de criação certificado como livre de brucelose ou em estabelecimento de criação monitorado para brucelose e tuberculose;
- Os testes de diagnóstico para tuberculose são obrigatórios para animais de idade igual ou superior a seis semanas, excetuando-se os animais com origem em estabelecimento de criação certificado como livre de tuberculose ou em estabelecimento de criação monitorado para brucelose e tuberculose.
- A partir de data a ser determinado pelo Departamento de Defesa Animal, o trânsito interestadual de bovinos e bubalinos destinados à reprodução só será permitido a animais com origem em estabelecimento de criação

certificado como livre de brucelose e de tuberculose ou em estabelecimento de criação monitorado para brucelose e tuberculose.

- A emissão da GTA para trânsito de bovinos ou bubalinos, qualquer que seja a finalidade, fica condicionada à comprovação de vacinação contra a brucelose no estabelecimento de criação de origem dos animais.
- O trânsito internacional de animais, sêmen e embriões rege-se-á pelas normas dispostas no Código Zoosanitário Internacional, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) ou conforme normas especificadas em acordos internacionais firmados.

De acordo com a IN 6, 2004; Na emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) para bovinos e bubalinos destinados à participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais devem ser observados os seguintes requisitos:

Para a brucelose:

- Atestado com resultado negativo a teste de diagnóstico para brucelose, efetuado até 60 dias antes do início do evento, para animais acima de oito meses de idade, emitido por médico veterinário habilitado ou, até 31 de julho de 2005 (alterado pela Instrução Normativa nº 59, de 24/08/2004) por médico veterinário cadastrado;
- Excluem-se dos testes os animais cujo destino final seja o abate, as fêmeas de até 24 meses de idade, desde que vacinadas entre três e oito meses de idade, os animais castrados e os animais procedentes de estabelecimento de criação livre de brucelose;
- Comprovação de vacinação contra brucelose no estabelecimento de criação de origem dos animais.

Para a tuberculose:

- Atestado com resultado negativo a teste de diagnóstico para tuberculose, efetuado até 60 dias antes do início do evento, para animais de idade igual ou superior a seis semanas, emitido por médico veterinário habilitado ou, até 31 de julho de 2005 (alterado pela Instrução Normativa nº 59, de 24/08/2004) por médico veterinário cadastrado;
- Excluem-se do disposto no item anteriores animais cujo destino final seja o abate e aqueles provenientes de estabelecimento de criação livre de tuberculose.
- Animais de rebanho geral destinados à participação em leilões ficam dispensados da apresentação de atestados com resultado negativo, exceto quando o serviço oficial estadual julgar necessário.
- A partir de data a ser determinada pelo Departamento de Defesa Animal, a emissão de GTA para participação de bovinos e de bubalinos em exposições, em feiras e em leilões de animais registrados fica condicionada à origem em estabelecimento de criação livre de brucelose e tuberculose.

O serviço de inspeção oficial participa do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.

Em colaboração com o serviço de defesa oficial, para melhorar a eficácia das ações da vigilância sanitária e do monitoramento do programa.

De acordo com a IN 6, 2004; São atribuições específicas do serviço de inspeção oficial:

- Realizar o abate sanitário de animais identificados como positivos para brucelose ou tuberculose;
- Cumprir procedimentos higiênico-sanitários e fazer o julgamento e destinação de carcaças e vísceras, conforme previsto na legislação pertinente;
- Comunicar ao serviço de defesa oficial os achados de matança, em carcaças e vísceras, sugestivos de tuberculose.

## 10. Discussão

Os diagnósticos laboratoriais devem levar o menor tempo possível para serem executados e para sair o laudo, tendo em vista que se for uma doença de notificação obrigatória, o proprietário fica com a sua propriedade interditada, ou seja, fica proibida a entrada e saída de animais do local, e não há um prazo máximo para o período de interdição. Diagnósticos laboratoriais devem ser bem específicos e com alta sensibilidade a fim de se evitar falsos negativos e falsos positivos. Devem se adequar a doença que é investigada de acordo com a epidemiologia de uma determinada área. Os Diagnósticos devem seguir uma linha para auxiliar na Prevenção e na Erradicação da doença. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento colocou os programas para meios de unificação de medidas de controle e erradicação da doença,mas não podemos comparar casos de uma doença endêmica em um município de Rondônia com o Distrito Federal, pois o número de propriedades rurais é diferente comsituações epidemiológicas diferentes. Os métodos de diagnóstico unificados servem para oficializar e padronizar o diagnóstico porem deve-se questionar se a padronização de exames laboratoriais realmente funciona em quadros epidemiológicos distintos. Por outro lado, a importância de métodos de diagnósticos unificados é incontestável, pois evita discussões sobre a veracidade e confiabilidade do teste.

Investigação de novas doenças, que ressurgem com o crescimento da população e possíveis contaminações cruzadas deve ser incentivada porem requer recursos financeiros e projetos científicos.

O Serviço de defesa animal realiza um grande trabalho no âmbito de evitar o surgimento de novas doenças que são prejudiciais à saúde humana e de outros animais.

O estágio contribuiu para a minha formação como médico veterinário e observar a realidade do trabalho no campo. Conhecimento da importância da notificação de doenças infecciosas.

## **11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Claudio S.L. de Barros, Manual de Coleta de Encéfalo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

COGGINS, L; NORCROSS, N.L., Immunodifusion reaction in equine infectious anemia. Cornell. Vet. Ithaca, v 60(2): p.330-5,1970.

E.M. Santos; P.M.C. Motta; M.B. Heinemann; R.C. Leite; J.K.P. Reis Avaliação da nested PCR em comparação aos testes sorológicos IDGA e ELISA para o diagnóstico da anemia infecciosa equina; Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.63 no.2 Belo Horizonte Apr. 2011.

Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal. Circular Técnica nº 29.

FERNANDES, C.G.; RIET-CORREA, F. Raiva. p.184-198. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. Doenças de ruminantes e equídeos. v.1, 3 ed – Santa Maria – RS, 2007b.

FLORES, E.F. Virologia Veterinária, p. 297-326; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

H. MOMTAZ e S. NEJAT Detection of Equine Infectious Anemia Virus in peripheral blood cells of horses in Iran Bulgarian Journal of Veterinary Medicine No 1, 18–22(2010).

<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> acesso em 19/02/2013.

<http://www.sa.df.gov.br/> acesso em 20/02/2013.

Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária Protocolos e técnicas. p.203-294.

Instrução Normativa Nº 27, de 20 de Abril de 2004.

Instrução Normativa Nº 45, de 15 de Junho de 2004.

Instrução Normativa Nº6, de 8 de Janeiro de 2004

Langemeier, J. L., S. J. Cook, R. F. Cook, K. E. Rushlow, R. C. Montelaro & C. J. Issel, 1996. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1481–1487.

LEW A.M., THOMAS L.M., HUNTINGTON P.J., A comparison of ELISA, FAST-ELISA and gel diffusion tests for detecting antibody to equine infectious anaemia virus, *Vet. Microbiol.*

LIESS B. & PRAGER D. (1976). Detection of neutralising antibodies (NIF) test: use of new technical equipment for laboratory swine fever diagnosis. In: CEC Seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. EUR 5486, 187–197.

Manual de Legislação – Programa Nacional de Sanidade Animal.

Manual do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNECBT).

MATHIAS, A.L. Brucelose Bovina e Equina. p.225-234. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. Doenças de ruminantes e equídeos. v.1, 3 ed – Santa Maria – RS, 2007b.

OIE. ***Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals***. Chapter 2.5.6 Equine infectious Anemia.

OLIVEIRA, M.C.S; Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

P.J QUINN; B.K.MARKEY; M.E.CARTER; M.J.DONNELLY; F.C LEONARD; Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. P.166-168 V.1, Porto Alegre – RS, 2007.

Portaria 168, Manual Técnico Raiva.

REIS, J.K.P. Produção de antígenos recombinantes gp90 e p26 do vírus da Anemia Infecciosa Equina para uso em imunodiagnóstico, 1997. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REIS, R. Anemia Infecciosa Equina – Diagnóstico Sorológico e Padronização do Teste de Imunodifusão. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Geral – UFMG, Belo Horizonte, 1984.

RODRIGUES, T.R; AVANZA, M.F.B; ZAPPA, V. Anemia Infecciosa Equina. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária – Janeiro de 2009.

SHANE, B.S., ISSEL, C.J. & MONTELARO, R.C. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 19, 351–355.

SILVA, A.R.S; Diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina: análise comparativa de sistemas comerciais de diagnóstico por imunodifusão. Tese (Mestrado em Microbiologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

SILVA, R.A.M.S.; ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevenção e controle no Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2001.

SOUTULLO, A.; VERWIMP.; RIVEROS, M.; PAULI, R.; TONARELLI, G. Design and validation of a synthetic peptide-based ELISA for equine infectious anemia (EIA) diagnosis using synthetic peptides. *Vet Microbiol*, n. 79, p. 111-121. 2001.

TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated

THOMASSIAN, A. *Enfermidades Infecciosas. Enfermidades dos Cavalos.* Varela. 5ed. p. 471-472. 2005.

W, R. Anemia Infecciosa Equina. p.62-70. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.;BORGES,J.R.J. *Doenças de ruminantes e equídeos.* v.1, 3 ed – Santa Maria – RS, 2007b.

WEILAND F., MATHEKA H.D. & BOHM H.O. (1982). Equine infectious anaemia: detection of antibodies using an immunofluorescence test. *Res. Vet. Sci.*, 33, 347–350.

## **12.Anexos**

### **12.1 FIGURAS**



Figura 01. Barreira na BR; Arquivo pessoal.



Figura 02. Antígeno para o teste AAT ou Rosa Bengala; Arquivo pessoal.

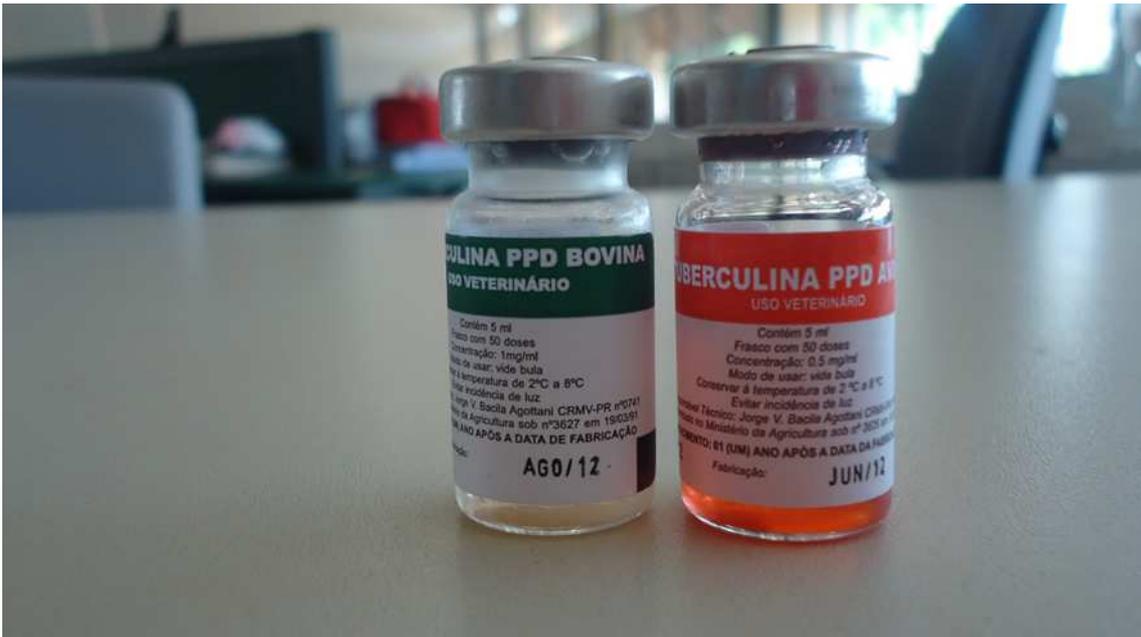


Figura 03. Tuberculinas (PPD bovina e PPD Aviária); Arquivo pessoal.

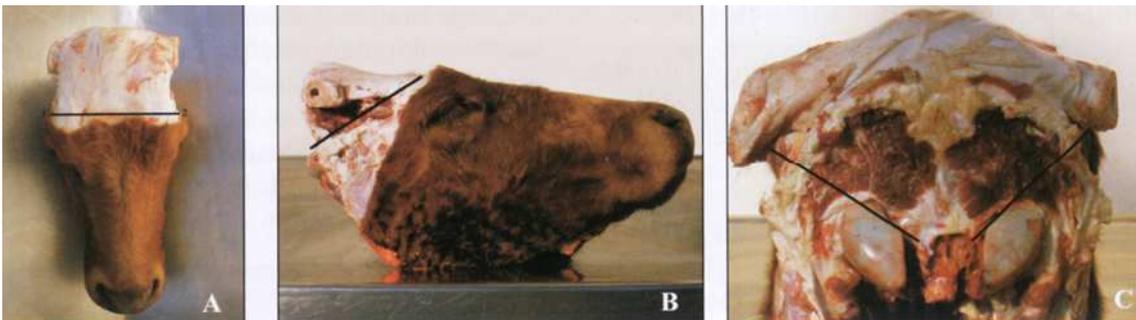


Figura 4. Técnica para retirada do encéfalo de bovinos. Local para retirar calota craniana e acessar encéfalo.

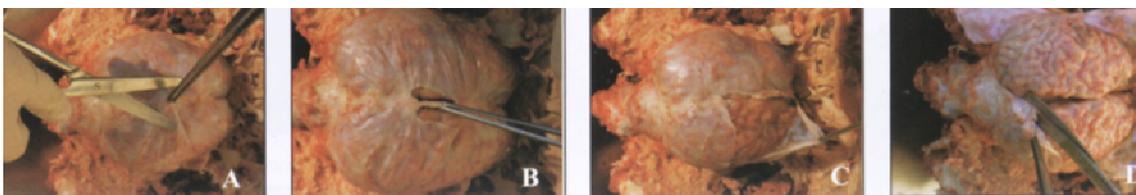


Figura 5. Técnica para retirada do encéfalo. Retirada da dura mater.

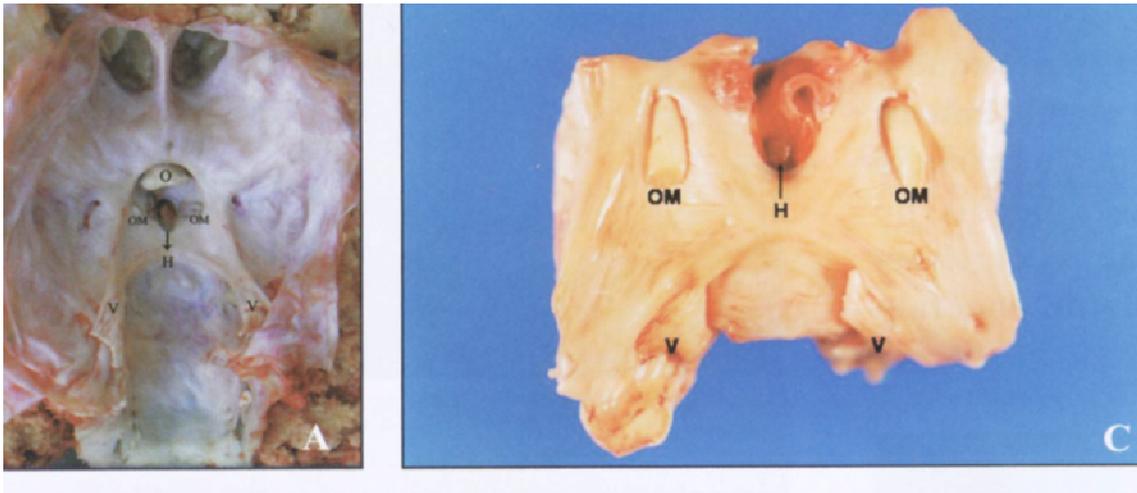


Figura 6. Técnica para retirada do conjunto Gânglio de Gasser (G) /hipófise (H) /rede admirável (R) (GRH). Assoalho da cavidade craniana, C - Vista dorsal do monobloco; Arquivo pessoal.

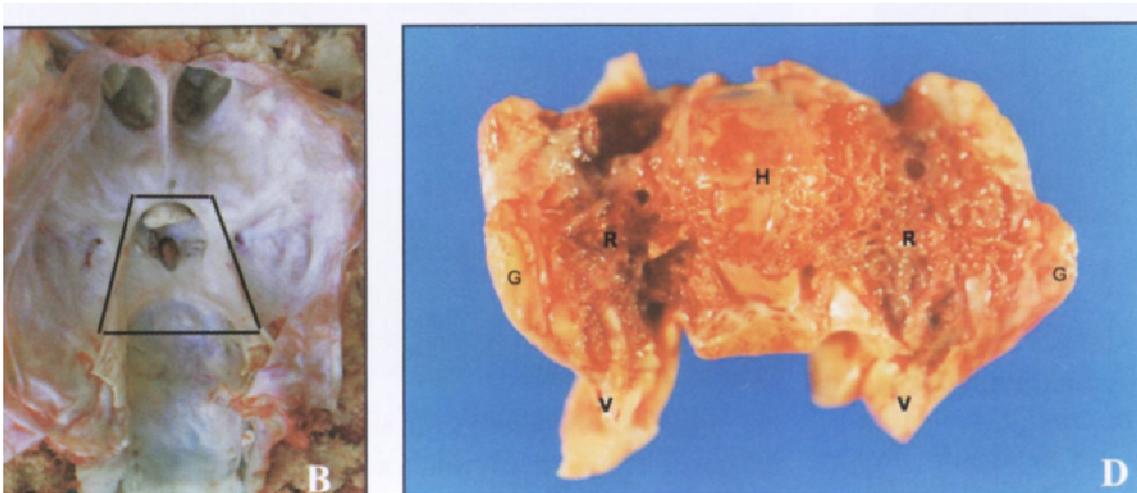


Figura 7. Secções para colheita do monobloco (GRH) D- Vista ventral do monobloco.



Figura 8. Coleta de encéfalo equino; Arquivo pessoal.



Figura 9. Encéfalo coletado; Arquivo pessoal.



Figura 10. Coleta de Sangue de Equino para teste sorológico. Diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina; Arquivo pessoal.



Figura 11. Centrifuga com amostras de sangue; Arquivo pessoal.



Figura 12. Soro depois de centrifugados prontos para envio para SFA. LANAGRO; Arquivo pessoal.



Figura 13. Soros para enviar para LANAGRO-PE. Contraprova; Arquivo pessoal.

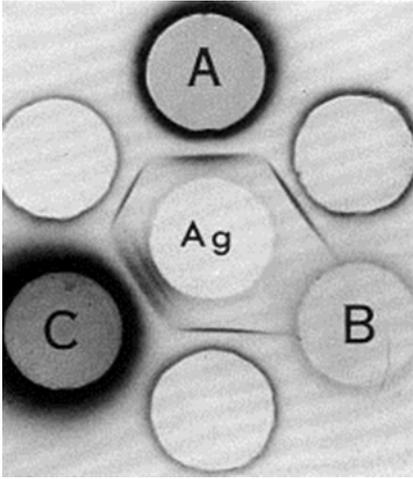


Figura 14. Teste de IDGA;



Figura 15. Medidor de temperatura digital; Arquivo pessoal.



Figura 16. Vacinas anti-rábicas e Febre Aftosa; Arquivo pessoal.



Figura 17. Sensor de temperatura; Arquivo pessoal.



Figura 18. Feto de Vaca Positiva para Brucelose; Arquivo pessoal.

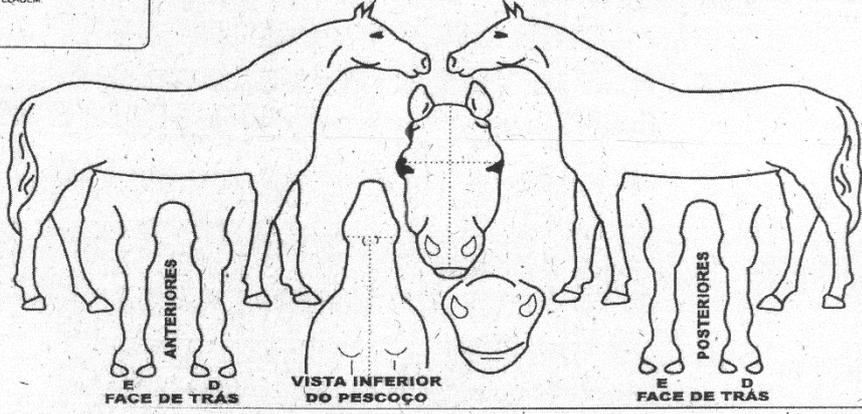


Figura 19. Área de Risco, Biossegurança baixa; Arquivo pessoal.



Figura 20. Vaca Positiva para Tuberculose; Arquivo pessoal.

## 12.2. Resenha

 <b>GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL - GDF</b> <b>SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DO DF - SEAPA</b> <b>Subsecretaria de Defesa e Vigilância Sanitária - SDS</b> <b>Diretoria de Defesa e Vigilância Sanitária - DDV</b>		
<b>CONTROLE DE ANIMAIS EM PROPRIEDADE FOCO DE AIE</b>		
<b>DADOS DO PROPRIETÁRIO:</b>		
Proprietário do Animal:		
Endereço:		Cidade / UF:
Telefone Celular:		Telefone Fixo:
RG:	Órgão Expedidor/UF:	CPF:
<b>DADOS DO ANIMAL:</b>		
Nome do Animal:		Nº do CHIP
Espécie: ( ) Equina ( ) Muar ( ) Asinina	Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea	Idade:
Local onde se encontra:		Nº de Equídeos do Proprietário:
Cidade / UF:		
PELAGEM		
		
Descrição do Animal:		

