



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA BRUCELOSE:
Revisão Bibliográfica

Vitória Régia Lima Campêlo
Orientador: Vitor Salvador Picão
Gonçalves

BRASÍLIA - DF
DEZEMBRO/2019



VITÓRIA RÉGIA LIMA CAMPÊLO

**MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA BRUCELOSE:
Revisão Bibliográfica**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Vitor Salvador Picão Gonçalves

BRASÍLIA DF
DEZEMBRO/2019

Ficha Catalográfica

Campelo, Vitória Régia Lima

Métodos Diagnósticos para Brucelose: Revisão Bibliográfica. / Vitória Régia Lima Campêlo; orientação de Vitor Salvador Picão Gonçalves. – Brasília, 2019.

p. : il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2019.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Vitória Régia Lima Campêlo

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Métodos Diagnósticos para Brucelose: Revisão Bibliográfica

Ano: 2019

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Vitória Régia Lima Campêlo

Vitória Régia Lima Campêlo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: CAMPELO, Vitória Régia Lima

Título: Métodos Diagnósticos para Brucelose: Revisão Bibliográfica

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 12/12/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vitor Salvador Picão Gonçalves

Julgamento: APROVADA

Instituição: FAV - UnB

Assinatura: V. L. C.

Prof. Dr. Marcos Bryan Hienemann

Julgamento: APROVADA

Instituição: FMVZ - USP

Assinatura: Marcos Bryan Hienemann

Profª. Drª. Simone Perecmanis

Julgamento: APROVADA

Instituição: FAV - UnB

Assinatura: Simone Perecmanis

AGRADECIMENTOS

Os cinco anos de curso passam voando. É um misto de “quero formar logo” com “vou viver na UnB o máximo que puder”. E finalmente o grande dia chegou. No trajeto até aqui muitas pessoas me deram suporte, e esta seção de agradecimentos é dedicada a elas.

Como centro dos meus agradecimentos, destaco meus pais que me deram liberdade para aprender com as minhas escolhas e erros e sempre estiveram presentes para comemorar as minhas vitórias. Eu tenho sorte de ser filha de vocês.

Gostaria de agradecer ao Pedro que viveu praticamente todas as fases da graduação comigo e desde o primeiro dia me incentiva, me elogia, me apoia e acredita em tudo o que eu sou e posso ser. À Louise que é a amiga mais doce do mundo, uma mulher admirável e que me inspira desde quando nos conhecemos. Sou grata também aos meus amigos da graduação que estiveram comigo nos mais diversos momentos.

Agradeço ao professor Vitor que aceitou me orientar e me deu ótimas oportunidades durante a graduação. Não poderia deixar de agradecer à Ana Lourdes, uma das mulheres mais inteligentes que conheci e que me ajuda desde o PIBIC. Agradeço a todas as veterinárias e veterinários que me inspiraram a querer ser tão boa quanto eles.

Na DISAF meu muito obrigada a todos os veterinários que acompanhei e que me ensinaram tanto sobre o importante trabalho que realizam. Foi 1 mês de trabalho muito gratificante. No LFDA-MG eu pude conhecer a fundo o porquê de serem um laboratório de referência e ao mesmo tempo conheci profissionais e pessoas incríveis. Obrigada por serem tão solícitos, compartilharem fotos, artigos e conhecimento comigo. Eu não poderia ter feito estágio em lugar melhor. Agradeço especialmente ao Mikael Hodon, meu supervisor de estágio que me ajudou demais do início ao fim. À Fabiana Xavier, ao Paulo Martins, à Marina Issa, aos técnicos, auxiliares, auditores, todo mundo que fez dessa experiência a melhor possível.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	1
PARTE I – MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE BRUCELOSE: REVISÃO DE LITERATURA	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. HISTÓRICO	2
3. CONCEITO	3
3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE	4
3.2. PATOGENIA	5
3.3. IMUNOLOGIA	5
3.4. DIAGNÓSTICO	6
3.5. MÉTODOS DIRETOS DE DIAGNÓSTICO	7
3.5.1. Isolamento e Identificação do Agente	7
3.5.2. Coloração	8
3.5.3. PCR	8
3.6. MÉTODOS INDIRETOS DE DIAGNÓSTICO	9
3.6.1. Soroaglutinação Lenta em Tubo/ 2-Mercaptoetanol	10
3.6.2. Rivanol	11
3.6.3. Antígeno Acidificado Tamponado	11
3.6.4. Teste do Anel em Leite	12
3.6.5. Fixação de Complemento	13
3.6.6. Teste de Polarização Fluorescente	14
3.6.7. ELISA Indireto e ELISA Competitivo	14
4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE NO CONTEXTO DO PNCEBT	16
5. REFERÊNCIAS	17

6.	PARTE II- RELATÓRIO DE ESTÁGIO	19
6.1.	INTRODUÇÃO	19
6.2.	SECRETARIA DE AGRICULTURA DO DISTRITO FEDERAL	19
6.2.1.	INTRODUÇÃO	19
6.2.2.	Foco de AIE	20
6.2.3.	Atendimento Suspeitas de Mormo	21
6.2.4.	Mortalidade acima de 10% em Granjas de Frango de Corte	22
6.2.5.	Vigilância Ativa Alimentação de Ruminantes	23
6.2.6.	Visita a Granja De Suínos	24
6.2.7.	Inquérito Brucelose e Tuberculose	24
6.3.	LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS	26
6.3.1.	INTRODUÇÃO	26
6.3.2.	Laboratório de Controle de Produtos Biológicos e Laboratório de Produção de Produtos Imunobiológicos	27
6.3.3.	Laboratório de Patologia Veterinária (LPV)	30
6.3.4.	Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal (MIC) 34	
6.3.5.	Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV)	35
6.3.6.	Laboratório de Doenças Bacterianas (DDB)	37
6.3.7.	Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA)	39
6.4.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE ABREVIações

PNCEBT-- Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose
TAL -- Teste do Anel em Leite
SAL -- Soroaglutinação Lenta em Tubos
AAT -- Antígeno Acidificado Tamponado
2-ME -- 2-Mercaptoetanol
PCR -- Reação em Cadeia da Polimerase
FP— Polarização Fluorescente
FC— Fixação de Complemento
ELISA— *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
DDB – Diagnóstico de Doenças Bacterianas
LDDV – Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais
CPB—Controle de Produtos Biológicos
LPV—Laboratório de Patologia Veterinária
MIC- Laboratório de Microbiologia
LFDA-MG—Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais
DISAF—Diretoria de Sanidade Agropecuária e Fiscalização

RESUMO

A brucelose é uma doença bacteriana zoonótica que causa prejuízos na produção animal e relacionados à saúde pública. Esta revisão de literatura objetiva descrever os testes mais importantes para diagnóstico da brucelose no mundo. O diagnóstico clínico da doença é difícil, por isso são utilizados métodos laboratoriais para correta detecção de animais infectados. Para brucelose existem vários métodos que podem ser utilizados. Os testes são classificados em métodos diretos ou indiretos, sendo o isolamento do microrganismo o padrão ouro de diagnóstico. Os métodos sorológicos são os mais utilizados por apresentarem boa eficiência na detecção dos animais infectados. Esses testes baseiam-se em reações de aglutinação e técnicas mais complexas como a fixação de complemento, polarização fluorescente e ELISA. No entanto, nenhum teste é 100% acurado. Geralmente, o soro sanguíneo dos animais suspeitos é testado por uma combinação de testes, um teste de triagem de alta sensibilidade seguido por um teste confirmatório de alta especificidade.

Palavras chave: Brucelose, diagnóstico, revisão, bacteriologia, sorologia, métodos moleculares.

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonotic bacterium disease that causes prejudices on animal production and in public health. This review aims to describe the most important tests used on brucellosis diagnosis in the world. The clinical diagnostic is not easy; hence the laboratory methods are used for the correct detection of infected animals. Several tests for the brucellosis diagnosis are available. They can be classified as direct and indirect methods, and the isolation of the agent is the gold standard of diagnosis. Serological methods are the most used because of its good efficiency to detect infected animals. These tests are based on agglutination techniques and more complex ones such as the complement fixation test, fluorescence polarization, and ELISA. However, none of the methods is 100% accurate. Generally, the sera

of suspect animals are tested by a combination of methods, a screening test of high sensitivity and a confirmatory test of high specificity.

Key words: Brucellosis, diagnosis, review, bacteriology, serology, molecular methods.

PARTE I – MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE BRUCELOSE: REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* são responsáveis por causar a brucelose, uma zoonose que induz abortos e infertilidade em mamíferos silvestres, animais domésticos de produção e gera sintomas graves e debilitantes em humanos.

O gênero inclui pelo menos 9 espécies reconhecidas: *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.ceti*, *B.pinnipedialis*, *B.neotomae* e *B.inopinata* (OIE, 2018). A correta identificação dos animais doentes é importante para a eficiência dos programas de controle e de vigilância epidemiológica da brucelose. Várias metodologias de teste estão disponíveis para ajudar no diagnóstico e, assim, tomar as providências diante dos focos de doença. Os testes são necessários em todas as etapas de intervenção contra a brucelose: avaliação da prevalência, eficácia das medidas de controle e erradicação e a confirmação de áreas livres de doença. (DUCROTOY et al, 2018).

2. HISTÓRICO

O médico britânico David Bruce foi o primeiro a isolar e descrever a bactéria *Brucella melitensis* (BRUCE, 1887). Ele organizou uma comissão de cientistas para entender a febre que acometia os soldados na Ilha de Malta e conseguiu isolar o patógeno a partir do baço de um soldado, nomeando o patógeno encontrado como *Micrococcus melitensis*. Bang, em 1897 na Dinamarca, 11 anos depois de Bruce,

isolou em vacas que estavam abortando, o microrganismo que mais tarde seria conhecido como *Brucella abortus* (BANG, 1897). O cientista conseguiu infectar experimentalmente vacas prenhes e provocar aborto, a doença ficou conhecida como doença de Bang (*Bang's disease*).

Em 1905, na ilha de Malta, Zammit, da mesma comissão que Bruce, demonstrou a natureza zoonótica da *B.melitensis* ao isolar o microrganismo do leite das cabras (GODFROID et al., 2005). Até então não era conhecida a relação entre essas duas novas bactérias isoladas. Foi somente em 1918 que a cientista americana Alice Evans observou a relação que existia entre as duas bactérias e sugeriu que elas deveriam ser classificadas como do mesmo gênero (EVANS, A. 1918). O nome do gênero foi escolhido em homenagem a Bruce, o cientista que isolou pela primeira vez a bactéria. (METCALF, 1994)

O primeiro teste para a detecção de anticorpos contra *Brucella* foi relatado por Wright e Smith há mais de 100 anos atrás (WRIGHT et al, 1897). O teste consistia em uma mistura de células bacterianas incubadas com o soro de um paciente humano em um tubo de vidro. Desde o primeiro teste, muitas coisas mudaram e vários testes sorológicos foram criados para aumentar a acurácia do diagnóstico sorológico (NIELSEN K; YU WL, 2010).

3. CONCEITO

A brucelose possui diversos métodos diagnósticos que podem auxiliar em seu diagnóstico. Cada um possui suas vantagens e desvantagens, sendo necessário analisar quais testes são os melhores para cada situação. A nível nacional, o PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose) e Tuberculose) define em seu manual os testes de triagem e os confirmatórios a serem utilizados para as ações de controle e erradicação da doença no Brasil. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) descreve os principais métodos de diagnóstico e estabelece quais devem ser usados para fins de comércio internacional (OIE, 2018)

Os testes diagnósticos são aliados importantes para chegar à conclusão de uma suspeita de doença. Eles não substituem o exame clínico nem os aspectos

epidemiológicos e devem ser interpretados dentro de um contexto. No âmbito da defesa sanitária, onde não se considera o indivíduo, e sim o conjunto de animais, a correta interpretação dos testes é muito importante. Os erros podem ter graves consequências, tanto econômicas como de saúde pública, à escala populacional. Ao se adotar um teste, ou associação de testes, fatores como custo, sensibilidade, especificidade, situação epidemiológica, objetivo do diagnóstico e praticidade devem ser levados em consideração. Também deve-se entender a relação do agente com o hospedeiro, como o teste funciona e entender suas limitações.

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE

As espécies do gênero *Brucella* são caracterizadas como cocobacilos gram negativos, medindo de 0,6 a 1,5 µm. Geralmente ocorrem em formas individuais e raramente se agrupam em pares ou cadeias. O microrganismo não forma esporos, é imóvel e não encapsulado, além disso é um patógeno intracelular facultativo que durante a infecção se multiplica e sobrevive no interior dos macrófagos. (MORENO, E. & MORIYÓN, 2006)

Na *Brucella*, como em outras gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) é um componente estrutural essencial da membrana externa. A molécula do LPS tem três seções: a do glicofosfolípídeo denominado lipídio A, um oligossacarídeo central e uma porção terminal, presente apenas nas brucelas lisas, a cadeia O. (LAPAQUE et al, 2005)

As cepas de *Brucella* que carregam o LPS completo apresentam colônias de textura lisa e as *Brucellas* que não possuem a cadeia O possuem colônias de aspecto rugoso. A transformação das colônias lisas em rugosas pode ocorrer espontaneamente por mutações como resultado de fatores ambientais, como a anóxia (MORENO & MORIYÓN, 2006).

Dentro do gênero *Brucella* são descritas nove espécies. *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B. neotomae*, *B.microti*, *B. pinnipedialis* e *B. ceti* expressam o fenótipo liso enquanto os biovars *B.abortus* RB51, *B.melitensis* B115 e as espécies *B. ovis* e *B. canis* têm tipicamente fenótipo rugoso em suas colônias (OIE, 2018). As

espécies se diferenciam pelo grau de patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas (CORBEL, 1997).

3.2. PATOGENIA

A via gastrintestinal é a principal porta de entrada para *Brucella*, porém, a bactéria pode entrar no organismo pelas soluções de continuidade na pele, via genital, via respiratória e conjuntivas (KO & SPLITTER, 2003). No trato gastrintestinal as bactérias são fagocitadas pelas células M da placa de Peyer e chegam aos linfonodos regionais, onde se alojam. Dentro das células fagocíticas impedem a fusão do fagolisossomo e sobrevivem. Começam a se proliferar dentro das células e a infecção chega a um nível de bacteremia onde o microrganismo se dissemina no organismo e se fixa nos órgãos pelos quais tem maior tropismo. Os tecidos de preferência da *Brucella* são órgãos genitais do macho, útero gravídico e glândulas mamárias. Também podem ser encontradas no baço, fígado, linfonodos, ossos e articulações (METCALF, 1994). É importante saber os tecidos de eleição da *Brucella*, pois são estes que devem ser coletados para diagnóstico.

3.3. IMUNOLOGIA

A *Brucella* é um patógeno intracelular que provoca a reação imunológica pela produção de anticorpos e pela resposta celular. O ambiente intracelular limita a exposição da *Brucella* aos mecanismos imunes inatos e adaptativos do hospedeiro e à ação dos antibióticos. Os anticorpos podem ser medidos em soro sanguíneo, secreções lácteas, muco vaginal, fluidos de higromas e plasma seminal. No entanto, as amostras mais utilizadas para diagnóstico são soro sanguíneo e secreções lácteas. (DUCROTOY ET AL., 2016)

O S-LPS (LPS das *Brucellas* lisas) é responsável pela ativação mais intensa da resposta para a produção de anticorpos. A maior produção é direcionada para a cadeia O, porém ainda há resposta contra o lipídeo A. A resposta imune provocada pelo S-LPS é linfócito T dependente e inclui a produção de IgM, IgG₁, IgG₂ e pequenas quantidades de IgA, com predominância de IgG₁. A mudança de IgM para

IgG ocorre rapidamente, com 4 dias em animais jovens e 7 dias em animais adultos. O padrão da resposta imune desencadeada se aplica para os animais recém vacinados e os infectados com a bactéria. A dominância do IgG₁ mostra que ele é fundamental no sorodiagnóstico. (NIELSEN K; YU WL, 2010). O IgM é responsável por reações falso-positivas nos testes sorológicos por apresentar reação cruzada com outras bactérias.

O comportamento das imunoglobulinas é muito parecido tanto na infecção natural como na produção de anticorpos pós-vacina, sendo difícil diferenciar uma infecção de reação vacinal. A diferenciação entre um animal infectado e um animal vacinado é um desafio do diagnóstico.

3.4. DIAGNÓSTICO

Desde o descobrimento da bactéria vários cientistas se esforçaram para criar um teste de alta acurácia para a doença, porém até hoje o diagnóstico se baseia na combinação de técnicas para evitar os resultados falso negativos e falso positivos (Poester et al., 2010). Poucas doenças possuem tantos testes diagnósticos como a brucelose (MORENO & MORIYÓN, 2006). Para elaborar bons testes diagnósticos foi necessário entender como o sistema imunológico reage à bactéria e também como a bactéria se relaciona com o hospedeiro.

O diagnóstico de brucelose deve ser conduzido a nível de rebanho (DUCROTOY et al, 2018). Um único animal positivo dentro do rebanho pode indicar o risco de outros animais estarem incubando a doença ou serem contaminados. O período de incubação pode ser longo e alguns animais mesmo portadores da doença, demoram a produzir anticorpos, sendo negativos nos testes.

A observação dos sinais clínicos e as informações epidemiológicas de um rebanho são importantes para o direcionamento da suspeita. Como ferramenta para o diagnóstico da brucelose existem os métodos diretos de diagnóstico que buscam isolar o agente e os métodos indiretos que objetivam detectar elementos de resposta do organismo à bactéria, os anticorpos. (MORENO & MORIYÓN, 2006; POESTER et al, 2005).

3.5. MÉTODOS DIRETOS DE DIAGNÓSTICO

Os métodos diretos buscam a identificação do agente, que pode ser feita a partir do cultivo e identificação das colônias, por provas bioquímicas, ou pode-se utilizar técnicas de biologia molecular como a PCR, que facilitam e aceleram o diagnóstico.

3.5.1. Isolamento e Identificação do Agente

O isolamento e identificação do agente é uma técnica muito importante para o diagnóstico da brucelose, pois quando se isola a bactéria das amostras coletadas o diagnóstico é definitivo (CORBEL, 2006). A probabilidade de isolamento é baixa, reduzindo a sensibilidade deste método. Uso de meios de cultura ou técnicas impróprias, crescimento de contaminantes na placa, morte da *Brucella* no tecido enviado, falha ao coletar os tecidos e cultura de tecidos não infectados são algumas das dificuldades que diminuem a sensibilidade do isolamento. (METCALF, 1994)

As amostras mais adequadas para o isolamento da *Brucella* em animais vivos são: swabs de secreções vaginais, amostras de leite e sêmen. Quanto às amostras pós aborto, devem ser de conteúdo estomacal, baço, pulmões e membranas fetais. Em carcaças de animais os melhores tecidos para cultura são: linfonodos da glândula mamária e dos genitais, baço, útero de animais prenhes ou no pós-parto e a glândula mamária (OIE, 2018).

O material encaminhado aos laboratórios para diagnóstico é de alto risco por se tratar de uma zoonose e por isso deve ser manipulado em laboratório com nível de biossegurança 3. A *Brucella* cresce em meios como o ágar sangue, ágar chocolate, ágar tripton de soja (TSA) e soro dextrose ágar. O soro bovino ou equino é constantemente adicionado ao meio porque algumas cepas precisam dele para o crescimento. As placas inoculadas devem ser incubadas de 35°C a 37°C em atmosfera de 5 -10% de CO₂ (ALTON, G. G. et al, 1975.).

Geralmente as amostras de campo vêm contaminadas com outras bactérias e se faz necessária a utilização de meio seletivo para evitar o crescimento dos contaminantes. Os meios seletivos mais utilizados são os de Kuzdas e Morse e o de Farrell. Esses meios contêm componentes que impedem o crescimento de bactérias que não sejam *Brucellas*. (POESTER et al., 2010)

O crescimento da cultura primária isolada das amostras de tecido pode demorar de dias a semanas para crescer. Após 48-72h de incubação a 37°C as colônias possuem de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, são convexas e têm borda circular. As colônias de *Brucella* lisa são transparentes e amarelo pálido e têm superfície brilhosa quando vistas contra luz. As *Brucellas* rugosas são mais opacas e têm superfície granular. A diferenciação de lisas e rugosas pode ser feita pela coloração com cristal violeta.(POESTER et al., 2010).

Após o crescimento das colônias devem ser feitos testes para confirmar se as culturas isoladas são mesmo de *Brucella* e para fazer a classificação em espécies. Morfologia da colônia, aglutinação com soro anti-*Brucella*, uréase, catalase e oxidase são a base para identificar as colônias como pertencentes ao gênero *Brucella*. Após a identificação são realizados outros testes para classificar as espécies e os biovars. Esses testes incluem: requerimento de dióxido de carbono (CO₂), produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), sensibilidade a corantes (tionina e fucsina básica) e outros (ALTON, G. G. et al, 1975.) Esses testes para tipificação são demorados e devem ser realizados por laboratórios de referência (POESTER et al., 2010).

3.5.2. Coloração

Amostras como esfregaços de cotilédones, secreções vaginais e conteúdo estomacal dos fetos podem ser coradas utilizando a técnica de Ziehl Neelsen modificada, conhecida como Stamp ou método de Koster. A presença de agregados intracelulares contendo organismos fracamente álcool ácido resistentes com morfologia correspondente à da *Brucella* é indicativo de infecção. É importante lembrar que outros microrganismos podem ter morfologia semelhante e serem confundidos, como: *Coxiella burnetti* e *Chlamydia spp.* (CORBEL, 2006).

3.5.3. PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método que possibilita o diagnóstico da brucelose e a caracterização das bactérias isoladas do campo. A

caracterização é importante para estudos epidemiológicos e taxonômicos. (POESTER et al., 2010).

As espécies terrestres de *Brucella* apresentam alto grau de homologies em seu DNA. Os polimorfismos existentes no DNA são suficientes para diferenciar as 6 primeiras espécies e alguns de seus sorovares. São utilizadas técnicas moleculares para fazer essa diferenciação (MORENO & MORIYÓN, 2006).

A PCR é uma técnica molecular que possibilita a identificação de um microrganismo a partir de seu DNA. Para identificação de *Brucella* existem técnicas de detecção gênero específica e técnicas de detecção espécie específica. (POESTER et al., 2010). A técnica gênero específica utiliza como alvo um gene bem conservado em todas as espécies de *Brucella*, possibilitando detectar a presença da bactéria, porém sem identificar a espécie. Geralmente se utiliza o gene BCSP31 e o operon rRNA 16S-23S. A identificação genérica é utilizada como triagem no diagnóstico de brucelose em humanos e identificação de contaminação em alimentos.

A técnica de diferenciação de espécies utiliza a técnica de PCR multiplex. O PCR multiplex utiliza dentro de uma mesma reação *primers* específicos para cada espécie de *Brucella*. No caso da AMOS PCR (PCR multiplex específico para diagnóstico de brucelose), a técnica consegue identificar *B. abortus* biovar 1, 2 e 4, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis* biovar 1, baseando-se no polimorfismo encontrado na localização de inserção da sequência IS711 no cromossomo da *Brucella* (BRICKER & HALLING, 1994). O PCR AMOS também é capaz de diferenciar as cepas utilizadas nas vacinas B19 e RB51 (POESTER et al., 2010).

3.6. MÉTODOS INDIRETOS DE DIAGNÓSTICO

As técnicas de sorologia são as mais utilizadas na rotina de diagnóstico de doenças animais (ALTON, G. G. et al 1975; CORBEL, 1997). A pesquisa de anticorpos específicos para um determinado agente é um método indireto de diagnóstico, pois não busca o isolamento do agente, mas a resposta que este provocou no hospedeiro.

Um resultado positivo em um teste indireto pode significar não só uma infecção ativa, mas também a existência de anticorpos e células de memória que persistem após vacinação, contato com o agente não seguido por doença, ou exposição a

bactérias que tem reação cruzada imunologicamente com gênero *Brucella*. Então, é importante interpretar o resultado laboratorial no contexto epidemiológico do rebanho (MORENO, E. & MORIYÓN, 2006).

A maioria dos testes empregados no diagnóstico da brucelose foi desenvolvida em função da dinâmica de formação dos anticorpos posteriores a um estímulo antigênico. A resposta de anticorpos após uma infecção por *B.abortus* patogênica caracteriza-se pelo aparecimento de quatro isotipos de imunoglobulinas: IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA. O isótipo IgG₁ segue um padrão semelhante, sem, no entanto, apresentar declínio com o passar do tempo. Esta classe é a mais importante do ponto de vista diagnóstico (NIELSEN K; YU WL, 2010).

3.6.1. Soroaglutinação Lenta em Tubo/ 2-Mercaptoetanol

O Teste de Soroaglutinação lenta em Tubo (SAL) consiste na incubação do antígeno extraído das células bacterianas da *Brucella* com o soro do animal a ser testado. Se o animal tiver anticorpos anti-*Brucella* no soro, ou seja, já teve contato com antígeno, ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo e esta ligação será visualizada macroscopicamente como aglutinação. Esse teste é mais eficiente para a detecção de anticorpos IgM e menos eficiente para detecção de IgG e isso diminui a especificidade do teste (NIELSEN K; YU WL, 2010).

O SAL não detecta anticorpos contra *B.canis* e *B.ovis* porque essas cepas de *Brucella* rugosa não possuem cadeia O em sua superfície e o antígeno da SAL é o LPS das *Brucellas* lisas que possuem a cadeia O. (POESTER et al., 2010)

O 2-Mercaptoetanol (2-ME) é um agente redutor utilizado para quebrar as pontes dissulfeto das imunoglobulinas M. O 2-ME é tóxico e deve ser utilizado tomando as devidas precauções, como a utilização de capela de biossegurança (Nielsen K; YU WL, 2010). Este teste é realizado em paralelo com a SAL com o objetivo de aumentar a especificidade da prova. Algumas imunoglobulinas G podem ser susceptíveis à redução pelo 2-ME, resultando em falsos negativos. (NIELSEN K; YU WL, 2010; BRASIL, 2017)

A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos do soro testados pelo SAL e dos soros testados com 2-ME. O PNCEBT preconiza a utilização da SAL/2-mercaptoetanol e da fixação de

complemento como provas confirmatórias aos soros reagentes à prova de triagem para brucelose (BRASIL, 2017).

3.6.2. Rivanol

A utilização do rivanol (Lactato de etacridina) reduz reações inespecíficas pela precipitação de glicoproteínas no soro, as moléculas que possuem alto peso molecular.

Adiciona-se o rivanol ao soro e depois centrifuga-se. O sobrenadante pode ser utilizado nos testes de aglutinação em placa pelo AAT ou soroaglutinação em tubo. Na precipitação das glicoproteínas do soro, a maioria das IgM precipita e as IgG permanecem no sobrenadante. (Nielsen K; YU WL, 2010; Poester et al., 2010).

3.6.3. Antígeno Acidificado Tamponado

O teste com antígeno acidificado tamponado (AAT) é um teste de aglutinação sorológica que utiliza o antígeno em concentração de 8% tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala (ALTON, G. G. ET AL, 1975). Como há reação cruzada entre o LPS da *B.abortus*, *B.melitensis* e *B. suis*, apenas um tipo de antígeno é necessário. Geralmente são utilizados *B.abortus* S99 ou S1119.3 como antígeno.(NIELSEN K & YU WL, 2010)

Foi observado que o IgM diminui sua atividade em pH ácido e o IgG aumenta sua capacidade de aglutinação, aumentando a especificidade do teste. (CORBEL, 1972; NIELSEN K & YU WL, 2010). O Rosa de Bengala atua como corante para melhor identificar a reação de aglutinação.

O animal positivo possui anticorpos anti-Brucella no soro sanguíneo, logo ao se misturar o soro de um animal positivo ao antígeno acidificado, espera-se que ocorra uma reação de aglutinação que poderá ser observada macroscopicamente com o auxílio de luz indireta. Não se deve considerar reações depois dos 4 minutos do início do teste, pois são formados coágulos de fibrina que podem ser confundidos com reações positivas. (BRASIL, 2017).

A prova do AAT é apropriada para testes de triagem por ser um teste sensível para identificar os animais infectados, além disso, é um teste barato e simples de ser realizado. Os anticorpos vacinais reagem e, por isso, testes confirmatórios devem ser realizados para diminuir o número de falsos positivos. O PNCEBT adota essa prova como método oficial de triagem (BRASIL, 2017).

3.6.4. Teste do Anel em Leite

O Teste do Anel em Leite (TAL) é um teste de aglutinação utilizando antígeno corado com hematoxilina. É uma prova diagnóstica de rebanho, portanto deve ser realizada com amostra de leite bovino fresco retirada de tanque. O TAL é uma ferramenta útil para identificar focos no rebanho testado. Caso o exame seja positivo, todos os animais devem ser testados sorologicamente (ALTON ET AL., 1988). O TAL é um método simples, barato, efetivo e bom para triagem, porém, os resultados não são satisfatórios quando a prova é realizada em leite de cabras e ovelhas nem quando o leite é pasteurizado. (CORBEL, 2006; METCALF, 1994).

As imunoglobulinas presentes na reação são IgM, IgG₁ e IgA, sendo a última a principal para o teste (SUTRA et al, 1986). As imunoglobulinas se ligam aos glóbulos de gordura presentes no leite pela porção do fragmento cristalizável (Fc). Se o leite contiver anticorpos anti-*Brucella*, o antígeno corado adicionado ao leite se ligará aos anticorpos que, por sua vez, estarão ligados aos glóbulos de gordura. Como os glóbulos de gordura são menos densos que a porção líquida do leite, estes migram para a superfície levando o antígeno-anticorpo, formando uma linha de corante na superfície. Em amostras negativas, o pigmento fica disperso pelo tubo pois o antígeno não terá anticorpo para se ligar (NIELSEN, 2010).

O TAL está sujeito a reações falsas causadas por leite anormal. O leite de animais com mastite, o colostro ou leite do fim da lactação diminuem a confiabilidade na análise. (NIELSEN, 2010).

3.6.5. Fixação de Complemento

O teste de fixação do complemento (TFC) é muito utilizado como teste confirmatório e é utilizado como tal no PNCEBT. Ele pode ser realizado como teste único após resultado positivo no AAT ou depois de resultado inconclusivo no 2-ME (BRASIL, 2017).

O sistema complemento faz parte da resposta imunológica humoral, são proteínas que quando ativadas auxiliam o sistema imunológico a combater o agente infeccioso. As proteínas formam um complexo de ataque à membrana e são capazes de lisar os antígenos por desequilíbrio osmótico. No teste de fixação de complemento, utiliza-se essa função de ataque à membrana celular do complemento como meio para diagnosticar a brucelose.

O teste utiliza a *B.abortus* como antígeno e o incuba com diluições do soro a ser testado. O soro precisa ter tido o complemento inativado a partir do calor, pois se utiliza uma fonte externa titulada de complemento, geralmente do soro de cobaia. Depois adiciona-se hemácias de carneiro sensibilizadas pelos anticorpos de coelho. Se existir no soro teste anticorpos contra *Brucella*, o complemento se ligará a este imunocomplexo (imunoglobulina do animal positivo+antígeno) e não sobrá complemento para se ligar aos anticorpos que estão ligados às hemácias de carneiro. O resultado de uma prova positiva é a não lise das hemácias, formando um botão de hemácias no fundo. O resultado negativo se visualiza com a lise das hemácias, pois houve a fixação de complemento nas hemácias sensibilizadas, o que provocou a hemólise visualizada (ALTON ET AL., 1988).

Em bovinos, somente as imunoglobulinas IgG₁ são fixadas pelo complemento de cobaia, então o TFC elimina as reações por IgM, IgG₂ e IgA. Quando o complemento bovino é adicionado à reação ele é capaz de fixar as outras imunoglobulinas (METCALF, 1994). Como o IgG é a única imunoglobulina que fixa eficientemente o complemento, o TFC possui alta especificidade (NIELSEN, 2010).

3.6.6. Teste de Polarização Fluorescente

O teste de Polarização Fluorescente (TPF) se baseia na velocidade de rotação de uma molécula dentro de uma solução. Quanto maior e mais pesada for uma molécula, menor sua taxa de rotação (NIELSEN ET AL., 1996; DUCROTOY ET AL., 2016). O teste utiliza como antígeno o OPS da *Brucella* marcado com fluoresceína (OIE, 2018). O analisador de polarização fluorescente lê a velocidade de rotação usando a luz polarizada.

Se o anticorpo anti-*Brucella* estiver presente no soro, leite ou sangue, e for adicionado o antígeno marcado, a taxa de rotação do antígeno irá diminuir pois ele se ligará ao anticorpo e essa velocidade será detectada pelo equipamento que utilizará a luz polarizada para medir (NIELSEN, 2002). A taxa de redução da rotação é proporcional a quantidade de anticorpos presentes (NIELSEN, 2010).

O TPF é simples de realizar e possui poucas etapas, poucas diluições, requer menos manipulação e poucos reagentes (NIELSEN ET AL., 1996). Foi um teste desenvolvido para ser utilizado a campo, aumentando a praticidade do diagnóstico (NIELSEN, 2002). É possível definir um ponto de corte entre reações positivas e negativas, sendo possível manipular sua sensibilidade/especificidade. Isso possibilita que o teste possa ser usado tanto como um teste de triagem sensível como um teste confirmatório com alta especificidade (NIELSEN, 2010).

3.6.7. ELISA Indireto e ELISA Competitivo

Elisa Indireto

O Elisa indireto (I-ELISA) tem como princípio detectar a ligação dos anticorpos presentes em um soro aos antígenos da *Brucella* imobilizados na placa. A detecção do complexo antígeno-anticorpo é realizada com a utilização de uma molécula marcada. Essa molécula, geralmente um anticorpo, pode ser marcada com isótopos de fluorocromos ou enzimas. (NIELSEN, 2002)

O I-ELISA não é capaz de diferenciar os anticorpos vacinais nem os anticorpos de reações cruzadas, mas é um teste com alta sensibilidade podendo ser utilizado como boa ferramenta de triagem. (POESTER et al., 2010; NIELSEN, 2010).

Nos ELISAS indiretos mais usados, o antígeno S-LPS, LPS das *Brucellas* lisas, é imobilizado nas placas de poliestireno. Nos poços das placas serão adicionados os soros diluídos a serem testados. Se houver anticorpos anti-*Brucella*, estes ficarão ligados à placa e não serão retirados pelas lavagens sucessivas realizadas durante o procedimento. A detecção dos anticorpos ligados é feita com a adição de um anticorpo monoclonal específico contra as imunoglobulinas anti-*Brucella* conjugado com a enzima peroxidase. Ao se adicionar o peróxido, substrato da peroxidase, esta enzima age formando cor. Quanto mais cor os poços apresentarem, maior a presença de anticorpos anti-*Brucella*.

Elisa Competitivo

No Elisa competitivo, como no I-ELISA, o S-LPS é utilizado imobilizado na placa (NIELSEN et al., 1996b). O soro a ser testado é adicionado aos poços junto com o anticorpo marcado, e se houver anticorpos no soro do animal, os dois competem pelos antígenos da placa.

O Elisa competitivo foi desenvolvido para eliminar alguns dos problemas relacionados com os anticorpos residuais da vacinação e dos anticorpos que tem reação cruzada com a *Brucella*. O teste C-ELISA seleciona um anticorpo monoclonal com afinidade maior com os antígenos do teste, diminuindo reação com anticorpos vacinais e inespecíficos para *Brucella*. E estes anticorpos monoclonais do teste possuem uma afinidade menor se comparados com os anticorpos oriundos da reação inflamatória contra *Brucella*. (POESTER et al., 2010; OIE, 2018)

A especificidade do C-ELISA é alta e o teste é capaz de identificar os anticorpos IgM, IgG1, IgG2 e IgA (NIELSEN, 2002). Por outro lado, é menos sensível que o I-ELISA. O C-ELISA é ótimo como teste confirmatório para diagnóstico de brucelose na maioria das espécies de mamíferos (NIELSEN, 2010).

4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE NO CONTEXTO DO PNCEBT.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, criado pelo MAPA em 2001, tem como objetivos principais a diminuição do impacto sanitário causado pela brucelose e tuberculose na saúde animal e humana visando a erradicação dessas zoonoses e conseqüentemente aumentar a competitividade da pecuária brasileira.

No âmbito da brucelose, o programa instituiu a vacinação obrigatória das fêmeas bovinas e estratégia para certificação das propriedades livres e controle do trânsito dos animais. Além disso, traçou estratégia diagnóstica que deve ser utilizada de forma padronizada para auxiliar os veterinários oficiais no saneamento dos focos.

O teste de triagem é o AAT, que pode ser feito por médicos veterinários habilitados, após realizarem um curso de formação reconhecido pelo MAPA. Para tanto, estes médicos veterinários precisam possuir infraestrutura física adequada à realização do teste. Os médicos veterinários habilitados também podem coletar o soro e enviar a um laboratório da rede credenciada. Se o resultado do AAT for positivo o animal pode ser sacrificado ou então realizados testes confirmatórios, em combinações definidas pela legislação. São estes: 2-ME/SAL, TPF e TFC. A opção por realizar testes confirmatórios visa melhorar a especificidade diagnóstica. O TAL também pode ser usado para detecção de rebanhos infectados, auxiliando em ações de vigilância sistemática da doença.

Os animais que podem ser testados são: fêmeas com idade superior ou igual a 24 meses (quando vacinadas com a B19), fêmeas com idade superior ou igual a 8 meses (quando vacinadas com a RB51) e machos destinados à reprodução com idade igual ou superior a 8 meses.

A estratégia diagnóstica envolve uma diversidade de testes indiretos e prevê a realização destes a campo e em laboratórios credenciados. Esta opção visa ajustar as demandas diagnósticas à complexidade logística que os médicos veterinários habilitados e do serviço oficial enfrentam no combate à brucelose, considerando o número de rebanhos e de animais que são atendidas e as longas distancias que frequentemente precisam ser percorridas entre os centros urbanos e as propriedades rurais. Desta forma, o PNCEBT busca equilibrar a fiabilidade e

atualização dos métodos diagnósticos ao dispor do Programa com o custo e a logística associados ao seu uso.

5. REFERÊNCIAS

ALTON, G. G. , JONES, LOIS M. & PIET; E., D. **Laboratory techniques in brucellosis**. v. 2 1975

BANG, B.. The etiology of epizootic abortion. J. **Comp. Pathol. Ther.** 10, 125–149. (1897) doi: 10.1016/S0368-1742(97)80014-8

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA N o 10, DE 3 DE MARÇO DE 2017. p. 1–10, 2017.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.11, p.2660-2666, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC264138/>>. Acessado em novembro de 2019.

BRUCE D., Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever, **Practitioner** 39 (1887) 161.

CORBEL, M. **Brucellosis in humans and animals**. [s.l.] World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.

CORBEL, M. J. Brucellosis: An Overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. Vol. 3, No, p. 213–221, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627605/pdf/9204307.pdf>>.

DUCROTOY, M. J. et al. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 81–102, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>>.

EVANS, A. C. Further studies on bacterium abortus and related bacteria: a comparison of bacterium abortus with bacterium bronchisepticus and with the organism that causes Malta fever. J. **Infect. Dis.** 22, 580–593. (1918) doi: 10.1093/infdis/22.6.580

GODFROID, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 313–326, maio 2005. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2005003>>.

KO,J; SPLITTER,G.A. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clin.Microbiol. Rev.**, v.6, n.1 p.65-78, 2003.

LAPAQUE, N. ; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, P. J. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion in Microbiology** 2005, 8:60–66

METCALF, H.E; LUCHSINGER, D.W; RAY, W.C. Brucellosis. Em BERAN, G.W, ed. **Handbook of zoonoses, section A: Bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic. Second edition**, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1994:9-39

MORENO, E. & MORIYÓN, I. The genus Brucella. In: **Prokaryotes**. [s.l: s.n.]1991p. 315–456.

NIELSEN K; YU WL. SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BRUCELOSIS. **Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA, XXXI**, v. 1, p. 65–89, 2010.

NIELSEN, K. et al. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to Brucella abortus. **Journal of Immunological Methods**, v. 195, n. 1–2, p. 161–168, 1996a.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 447–459, 20 dez. 2002.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. Bovine IgM: Does it fix guinea pig complement in the absence of bovine complement components? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, n. 4, p. 335–343, 1987.

NIELSEN, K. H. et al. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 26, n. 1, p. 17, 1996b.

OIE. Brucellosis (BRUCELLA ABORTUS, B. MELITENSIS AND B SUIS) (INFECTION WITH B ABORTUS, B.MELITENSIS AND B. SUIS). In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019**. [s.l: s.n.]p. 355–398.

POESTER P. F. et al. Diagnosis of Brucellosis. **The open Veterinary Science Journal**, v. 4, n. 7662, p. 46–60, 2010.

POESTER, P. F; SAMARTINO, E. L; LAGE, P. A ANDREY. Diagnóstico Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. n.47.p13-29,2005

SUTRA, L.; CAFFIN, J. P.; DUBRAY, G. Role of milk immunoglobulins in the brucella milk ring test. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 359–366, 1986.

WRIGHT, A. E.; SMITH. F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid fever and Malta fever. 1897. **BMJ** 1:1214-1215.

6. PARTE II- RELATÓRIO DE ESTÁGIO

6.1. INTRODUÇÃO

Este relatório de estágio supervisionado obrigatório descreve as atividades realizadas no período de 15 de agosto a 22 de novembro de 2019. O estágio foi realizado na Secretaria de Agricultura do Distrito Federal (SEAGRI-DF) e no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG), totalizando as 480 horas exigidas. Com duração de um (1) mês na SEAGRI-DF e dois (2) meses no LFDA-MG.

6.2. SECRETARIA DE AGRICULTURA DO DISTRITO FEDERAL

6.2.1. INTRODUÇÃO

A Defesa Sanitária Agropecuária é uma atividade realizada pelo poder público que possui órgãos representantes nas esferas federais, estaduais e municipais. No Distrito Federal a Diretoria de Sanidade Agropecuária e Fiscalização (DISAF) tem o papel de realizar as atividades propostas nos programas e planos formulados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A DISAF trabalha para garantir a sanidade da produção animal e vegetal com foco no Distrito Federal. Com isso, evita que doenças que trazem grandes prejuízos econômicos e de saúde pública para o país se espalhem pelos rebanhos do DF e conseqüentemente passem para outros estados.

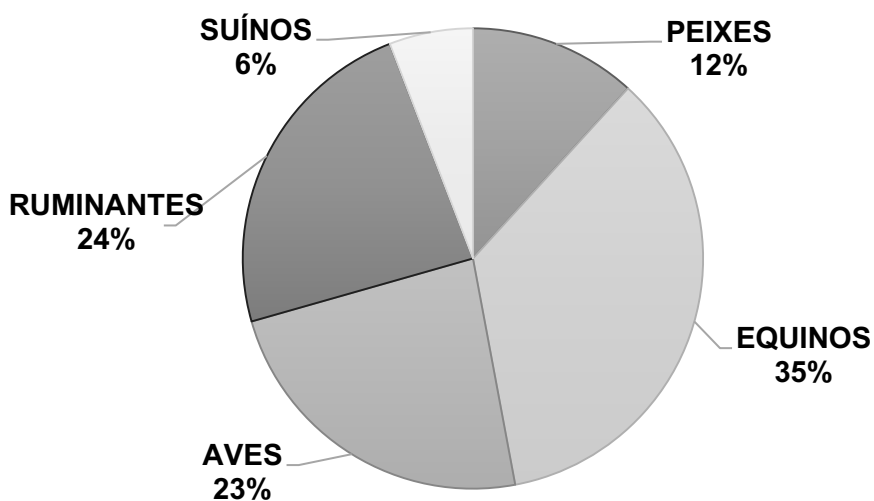
Qualquer cidadão que tiver ou for arrendatário de uma propriedade com exploração agropecuária no Distrito Federal deve ter um cadastro junto a Secretaria de Agricultura. O cadastro é fundamental para o trabalho dos veterinários oficiais. A partir dele é possível conhecer o perfil da propriedade, acompanhar o status vacinal dos rebanhos, emitir guias de trânsito animal (GTA) e realizar ações como interdição do trânsito animal da propriedade. O cadastro é uma ferramenta de

grande valor para planejar estratégias em casos de focos de doenças e para realizar atividades de vigilância ativa e passiva.

A DISAF atua emitindo licenciamento sanitário para eventos agropecuários, atende notificações obrigatórias de doenças animais, exige comprovação da vacinação contra brucelose e febre aftosa e faz acompanhamento dos estabelecimentos que vendem a vacina da Febre Aftosa e/ou Brucelose. E dessa maneira fiscaliza a atividade agropecuária no DF garantindo o controle e erradicação de doenças de notificação obrigatória.

O estágio na DISAF foi realizado durante o período de um mês e possibilitou a participação em diversas visitas de fiscalização. A figura 1 mostra a porcentagem de visitas realizadas para cada categoria animal. O relatório foi dividido por motivo de visita.

FIGURA 1- Porcentagem de visitas técnicas realizadas durante 1 mês por categoria animal.



6.2.2. Foco de AIE

Junto aos veterinários oficiais foi realizada visita a uma propriedade foco de AIE para tomada de ações previstas na Instrução Normativa número 45 de 15 de junho

de 2004 que estabelece normas para prevenção e controle da Anemia Infecciosa Equina (AIE).

Para emitir a GTA de equídeos os proprietários devem ter um exame para AIE válido (sessenta dias de validade) e os laboratórios credenciados, quando obtêm um resultado positivo, devem enviar o resultado exclusivamente para o serviço de defesa da UF. Na visita em questão, o proprietário realizou exame de AIE para emitir GTA e o serviço de defesa do DF realizou a visita para informar que houve resultado positivo e que a propriedade seria considerada área de foco para AIE e que seriam tomadas medidas para saneamento do foco.

Após detectado o foco, as ações realizadas foram: A propriedade foi interditada para trânsito animal, o sangue de todos os animais da propriedade e da região perifocal foi coletado e enviado para laboratório oficial e o animal positivo foi encaminhado para eutanásia. O proprietário foi informado que nenhum animal poderia entrar ou sair para evitar que a doença se difunda e que a desinterdição ocorreria quando se obtivesse dois exames consecutivos negativos em todos os animais com intervalo de 30 a 60 dias. Porém, quando o resultado dos exames de todo o rebanho chegou, mais um animal foi reagente à prova. (BRASIL, 2004)

Com a presença de mais um animal positivo no teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) realizado por laboratório oficial, as atividades de saneamento de foco tiveram que ser reiniciadas. O animal reagente ao teste foi encaminhado para eutanásia e a coleta de sangue dos animais foi agendada. Nenhum animal do perifoco foi reagente à prova de IDGA. Até o fim do estágio na DISAF, não houve atualizações sobre esse caso.

Foi possível perceber que a abordagem ao proprietário tem que ser feita com bastante cautela, pois está se lidando com bens de valor e interrupção provisória de atividade econômica e os proprietários podem reagir mal a isso.

6.2.3. Atendimento Suspeitas de Mormo

A instrução normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018 estabelece as ações que devem ser tomadas para prevenção, controle e erradicação do mormo. De acordo com ela, deve-se notificar ao serviço veterinário oficial (SVO) qualquer caso suspeito de mormo. Para o trânsito dos equídeos é obrigatório a apresentação de

exame com resultado negativo para emissão de GTA. Quando os animais apresentarem sintomas sugestivos de mormo a notificação é obrigatória ao serviço de defesa que coleta sangue e envia ao laboratório oficial do MAPA (IN). Foram realizadas quatro visitas durante o estágio relacionadas com o mormo.

Foi realizada visita para atender notificação no Hospital Veterinário de Grandes Animais da Granja do Torto-UnB. O animal apresentava sinais respiratórios e possuía feridas nas narinas. Foi coletado sangue para envio ao LFDA-PE que realiza o diagnóstico de mormo.

Em outra visita dois animais de um haras foram positivos em provas de triagem, e o haras ficou fechado para trânsito animal. O proprietário contestou os resultados, pois os animais seriam eutanasiados. E por determinação do juiz, o SVO teve que realizar maleinização nos animais. Um dos animais apresentou edema moderado em pálpebra inferior e outro não apresentou reação. Até o fim do estágio não havia sido tomada decisão para esse caso.

6.2.4. Mortalidade acima de 10% em Granjas de Frango de Corte

Foram realizadas quatro visitas a granjas de frangos com aptidão para corte. Todas as visitas foram pelo mesmo motivo. O médico veterinário responsável pela granja, trabalhador ou proprietário é obrigado a fazer notificação ao órgão estadual de defesa animal quando houver mortalidade acima de 10% no lote. Esse lote só é liberado para abate quando recebe laudo do material colhido nos processos de vigilância ou recebe visita técnica de veterinário oficial atestando que não há sinais clínicos de doença de notificação obrigatória, como doença de Newcastle ou Influenza Aviária.

Nas visitas foram observadas as condições das instalações, uniformidade do lote, presença de animais moribundos. Eram feitas perguntas sobre em que momento ocorreu mais mortalidade e se a morte foi progressiva ou em forma de surto. Observou-se a presença ou não de sinais respiratórios e foi realizada necropsia de algumas aves, porém nenhuma coleta foi realizada. Algumas granjas também atingiram os 10% por eliminarem os frangos que não atingiram o peso adequado para o abate. Essas granjas também precisam fazer a notificação para poderem encaminhar as aves para o abatedouro.

Em todas as visitas o registro diário da granja era utilizado para realizar o termo de fiscalização (TF), neste termo consta a descrição da visita realizada no estabelecimento e podem ser feitas recomendações de melhoria às instalações e limpeza para evitar problemas. O TF tem que ser anexado ao Boletim Sanitário, documento exigido pelo SIF para liberação das aves para o abate.

6.2.5. Vigilância Ativa Alimentação de Ruminantes

Propriedades da região do Currealinho em Brazlândia foram aleatoriamente selecionadas para terem fiscalizadas a alimentação dos ruminantes. Consiste em uma fiscalização surpresa onde os proprietários e funcionários da fazenda não sabem o propósito da visita. São feitas perguntas sobre a alimentação dos ruminantes e inspeção dos cochos e depósitos. Se algo suspeito for encontrado, é coletado para envio aos laboratórios oficiais.

De acordo com a Instrução Normativa nº 08/2004, a alimentação com cama de frango e produtos que contenham farinha de sangue e/ou ossos e dejetos de suínos é proibida para ruminantes (BRASIL, 2004). Essa medida visa garantir que não ocorram casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB). A Instrução Normativa nº 41/2009 prevê que se for comprovada a alimentação dos ruminantes com o alimento proibido, os animais serão marcados e o proprietário terá 30 dias para providenciar o abate dos mesmos (BRASIL, 2009). Caso contrário, os animais serão eutanasiados e destruídos pelo serviço de defesa e o proprietário não terá direito a nenhuma indenização.

O infrator estará sujeito a multas e até reclusão conforme previsto no Código de Defesa do Consumidor (art. 10 - fornecer produtos nocivos à saúde pública); Código Penal (art. 259 - difundir doença que possa causar dano aos animais; art. 268 – propagar doença contagiosa); Decreto 3.179/99 e Lei 9605/98 (crimes ambientais). Nas visitas realizadas nada de suspeito foi encontrado. Porém, em outra região foi feita uma visita para desinterdição de uma propriedade onde havia sido encontrado alimento suspeito. Os resultados da análise descartaram a suspeita e a propriedade pode ser desinterditada.

6.2.6. Visita a Granja De Suínos

Foi realizada visita em unidade de produção de leitões (UPL), onde foi realizada coleta de sangue de algumas matrizes para teste de rotina para Peste Suína Clássica. A visita aos estabelecimentos produtores de suínos para realização de vigilância ativa é medida preconizada pelo plano estratégico Brasil Livre de PSC. As amostras de soro são encaminhadas aos LFDA para realização de testes diagnósticos.(BRASIL, 2019)

6.2.7. Inquérito Brucelose e Tuberculose

A DISAF selecionou todas as propriedades do Distrito Federal que possuíam búfalos em seu cadastro para realizar tuberculinização e colheita de sangue para exames sorológicos de brucelose. Foram realizadas visitas para aplicação das tuberculinas (aviária e bovina) e colheita de sangue e outra para leitura do teste de tuberculinização.

Somente médicos veterinários oficiais ou habilitados podem realizar o teste de tuberculinização. As tuberculinas devem ser controladas pelo Serviço De Defesa Agropecuária (SDA). O teste é realizado na região cervical de bovinos e bubalinos. São selecionadas duas áreas que devem ser medidas com o cutímetro e deve ser feita a aplicação da PPD bovina e PPD aviária após tricotomia prévia. Todas as etapas devem ser realizadas pela mesma pessoa. O resultado é lido após 72 horas \pm 6 horas.

Na instrução normativa SDA nº 10, de 3 de março de 2017 está disponível tabela para análise dos resultados obtidos e os resultados da medição são analisados por essa fórmula: $(\Delta B - \Delta A)$, onde ΔB significa a diferença entre a espessura da dobra de pele depois da aplicação da tuberculina bovina e antes da aplicação. E ΔA significa a variação da espessura da dobra de pele depois e antes da tuberculina aviária. Ainda não existem valores específicos para bubalinos, então se usa os mesmos de bovinos, que podem ser vistos na tabela 1.

TABELA 1- Valores para interpretação da tuberculinização.

$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\leq 1,9$	negativo
2,0 a 3,9	inconclusivo
$\geq 4,0$	positivo

Os testes de triagem para Brucelose podem ser realizados por médico veterinário habilitado e oficial ou serem enviadas para rede de laboratórios oficiais do MAPA. Porém, os testes confirmatórios devem ser realizados somente pelos LFDAs. Como teste de triagem podem ser realizados o TAL (Teste do Anel em Leite) ou AAT (Antígeno Acidificado Tamponado) e como teste confirmatório existe o 2-ME (2 Mercaptoetanol), fixação de complemento e polarização fluorescente. Os testes confirmatórios são realizados apenas em animais reativos nas provas de triagem. As fêmeas vacinadas com B19 são testadas após ou com 24 meses e as vacinadas com RB51 podem ser testadas a partir dos 8 meses. Somente os machos destinados à reprodução e com idade igual ou superior a 8 meses são testados. (BRASIL, 2017)

FIGURA 2- (A) Coleta de sangue em búfala em inquérito tuberculose e brucelose. (B) Necropsia em frango em granja com mais de 10% de mortalidade. (C) Coleta de sangue em matriz para exame de PSC. (D) Frango refugo em granja.



6.3. LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS

6.3.1. INTRODUÇÃO

O LFDA-MG faz parte da rede de laboratórios oficiais do MAPA. Está localizado na cidade de Pedro Leopoldo no estado de Minas Gerais. Existem mais 5 LFDAs que

compõem a rede, estão localizados no estado do Pará, Rio Grande do Sul, Goiás, São Paulo e Pernambuco. O LFDA-MG é responsável pelo diagnóstico de diversas doenças animais e vegetais, além de realizar análises em alimentos para garantir a segurança alimentar dos brasileiros e dos consumidores internacionais.

As atividades laboratoriais estão integradas às ações de fiscalização contribuindo para garantia do status sanitário do país e do controle e saneamento de doenças animais e pragas vegetais.

O laboratório tem o papel de manter sua evolução tecnológica e analítica em consonância com as legislações de defesa agropecuária nacionais e para tal, utiliza metodologias internacionalmente reconhecidas. Isso explica o porquê de o laboratório possuir equipamentos modernos, infraestrutura e pessoal capacitado.

O laboratório é acreditado pelo INMETRO na ISO 17.025. Essa norma inclui uma série de procedimentos a serem seguidos pelos laboratórios de ensaio que garantem a qualidade e confiabilidade dos resultados.

Este relatório reúne a experiência de estágio obtida durante os dois meses de rodízio dentro das áreas do laboratório que pode ser visualizado na tabela 2. Foi realizado estágio tanto na área de alimentos como na área de diagnóstico animal.

TABELA 2 - Cronograma de Estágio no LFDA-MG

	30/09-05/10	7-11/10	14-18/10	21-25/10	28/10-01/11	4-8/11
LDDV			X		-	
DDB				X	-	
LPV	X				-	
MIC		X			-	
RCA					-	
IQA					-	X

6.3.2. Laboratório de Controle de Produtos Biológicos e Laboratório de Produção de Produtos Imunobiológicos

O setor de Controle de Produtos Biológicos (CPB) é responsável por controlar a qualidade da vacina contra a brucelose e os antígenos utilizados para diagnóstico da brucelose. O setor também faz controle de qualidade de tuberculinas e qualidade e potência das vacinas para as clostridioses. No setor de Produção de Produtos

Imunobiológicos (PPI) são produzidos os antígenos para diagnóstico da brucelose, a tuberculina bovina e aviária e toxinas botulínicas C e D. Os Materiais biológicos feitos no PMR são testados no CPB e utilizados como padrão nas indústrias brasileiras.

Os padrões de referência da OIE são utilizados para comparação e calibração de qualquer outro padrão produzido. Os padrões de referência estão disponíveis para os laboratórios nacionais de referência para que produzam padrões que devem ser utilizados na indústria para fabricação de qualquer material de diagnóstico para rotina diária de laboratórios. O uso desses padrões promove harmonização mundial dos antígenos utilizados em testes diagnósticos. (ALAWAD; MUSA, 2010)

O CPB é laboratório de nível 3 de biossegurança por manipular microrganismos de alto risco para humanos. No CPB foi possível acompanhar alguns dos testes realizados para controle da vacina para brucelose e do AAT. Os testes realizados cumprem o estabelecido pela IN 15 de 19 de fevereiro de 2004 que regulamenta o controle de qualidade dos antígenos para diagnóstico da brucelose e da vacina.

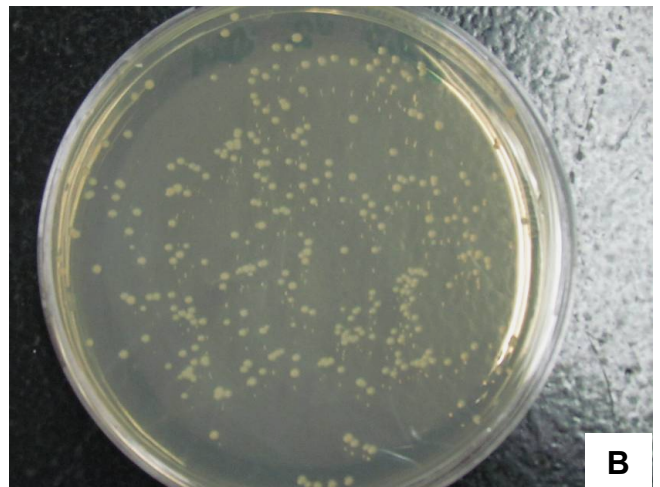
Todas as partidas de vacina contra Brucelose produzidas devem ser enviadas em embalagem comercial para o controle oficial. São feitos os seguintes testes: pureza, dissociação, contagem de microrganismos viáveis, umidade e pressão negativa. Alguns desses testes são reprovatórios e outros, ao terem os resultados somados, podem reprovar a vacina. Para serem aprovadas, as partidas devem obter necessariamente resultados satisfatórios nos testes de contagem de microrganismos viáveis, não podem ter mais que 5% de colônias rugosas e não podem conter contaminantes viáveis (BRASIL, 2004). Os resultados das provas são colocados em uma tabela que calcula se as vacinas podem ser aprovadas para comercialização ou não.

Os antígenos para diagnóstico sorológico de brucelose também são submetidos ao controle oficial de qualidade antes de irem para o mercado. Os antígenos a serem testados são comparados com o antígeno de referência produzido no PPI. Passam pelo controle de qualidade: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Antígeno para Soroaglutinação Lenta (SAL) e Antígeno para Teste do Anel do Leite (TAL). São feitos testes de pureza e esterilidade, sensibilidade, concentração celular e pH. Para serem aprovados, os antígenos precisam estar livres de contaminação, ter

sensibilidade adequada e pH dentro da faixa para cada tipo de antígeno. (BRASIL, 2004)

No PPI foi possível acompanhar um teste de validação para um Western Blot utilizando antígeno extraído de cepas autóctones de *Burkholderia mallei*. O objetivo da validação desse método é disponibilizar mais uma ferramenta para o diagnóstico do mormo. O LFDA-MG não realiza teste para mormo em sua rotina, porém fabricava a maleína que agora só é utilizada como teste complementar

FIGURA 3- Fotos A-C procedimentos de verificação da qualidade de vacina para Brucelose. (A) Uso de centelhador para verificar presença de vácuo. (B) Crescimento de Brucella em meio Triptose. (C). Coloração com Cristal Violeta para verificar dissociação. (D) Esterilidade e pureza da vacina. **Fonte:** Laboratório de Controle de Produtos Biológicos- CPB/LFDA-MG



6.3.3. Laboratório de Patologia Veterinária (LPV)

O laboratório de patologia veterinária recebe amostras para diagnóstico hispatológico de qualquer doença, porém, com maior frequência recebe amostras com suspeita de tuberculose. Foi possível acompanhar todo o processamento das amostras que chegam para o diagnóstico histopatológico de tuberculose.

As amostras são infecciosas e devem ser manipuladas em laboratório com biossegurança 3. As caixas de amostras são abertas e os pacotes lacrados são retirados e colocados dentro da capela de biossegurança onde o operador estará protegido contra o formol e os possíveis agentes infecciosos. O operador deve se paramentar e utilizar luvas anticorte. Dentro da capela o lacre é conferido com o documento da amostra. No documento está escrito a suspeita do solicitante do exame, os tecidos enviados, informações de origem das amostras, destinação da carcaça e número do lacre. As amostras vêm dentro de potes imersas em formol.

A clivagem é a primeira etapa do processamento feito no laboratório. Consiste em cortar os tecidos que se deseja visualizar nas lâminas. É importante selecionar porções em que se possa visualizar a área sã e área afetada. Deve-se fazer cortes finos e com movimento de corte único, sem fazer movimento de serragem pois a técnica de corte interfere na qualidade das lâminas. Os tecidos cortados são colocados em cassetes que foram previamente identificados com o número da amostra e são colocados dentro do formol para fixação.

Na etapa seguinte se utiliza um equipamento chamado histotécnico que é um processador automático de amostras. Dentro do equipamento as amostras são desidratadas em banhos de álcool em concentrações crescentes até o álcool absoluto. A parafina ocupará o espaço da água retirada dos tecidos, conferindo uma maior resistência.

A próxima etapa é chamada de inclusão e consiste em dispor os tecidos em posição adequada para confecção da lâmina e também possibilita o corte no micrótomo. Se utiliza a parafina líquida para formar um bloco único da amostra.

Na microtomia o micrótomo é utilizado para retirar cortes muito finos da amostra, possibilitando a observação no microscópio. Primeiro é realizado o desbaste, que retira a camada de parafina mais grossa que ainda não contém o tecido e depois

se diminui a espessura do corte para fazer a lâmina. É importante que os cassetes estejam bem gelados para se obter um melhor corte. Retira-se uma fita feita pelo micrótomo e se coloca num banho maria a 45° C. A fita de parafina se estica na água morna e assim é possível colocá-la na lâmina.

Após a confecção das lâminas estas ficam em estufa para derreter a parafina residual e podem passar para a etapa de coloração. A coloração tem o objetivo de conferir contraste para as estruturas celulares facilitando a identificação. As lâminas para diagnóstico histopatológico de tuberculose são coradas com hematoxilina e eosina e coloração de *Ziehl Neelsen*. Para melhorar a visualização utiliza-se o azul de metileno para corar o fundo e melhorar a visualização. É importante sempre utilizar o controle positivo e negativo para assegurar o funcionamento da técnica e do corante.

Coloração de *Ziehl Neelsen*

O método de Ziehl é utilizado para diagnosticar infecções causadas por bactérias álcool-ácido resistentes, principalmente as do gênero *Mycobacterium*. Essas bactérias são mal coradas pelo método gram devido ao alto conteúdo hidrofóbico em suas paredes celulares. O primeiro passo consiste em utilizar o corante Fucsina que irá corar todas as estruturas de vermelho, depois é utilizado uma solução álcool-ácido como descolorante e os bacilos permanecerão vermelhos pois são resistentes a descoloração.

Tuberculose

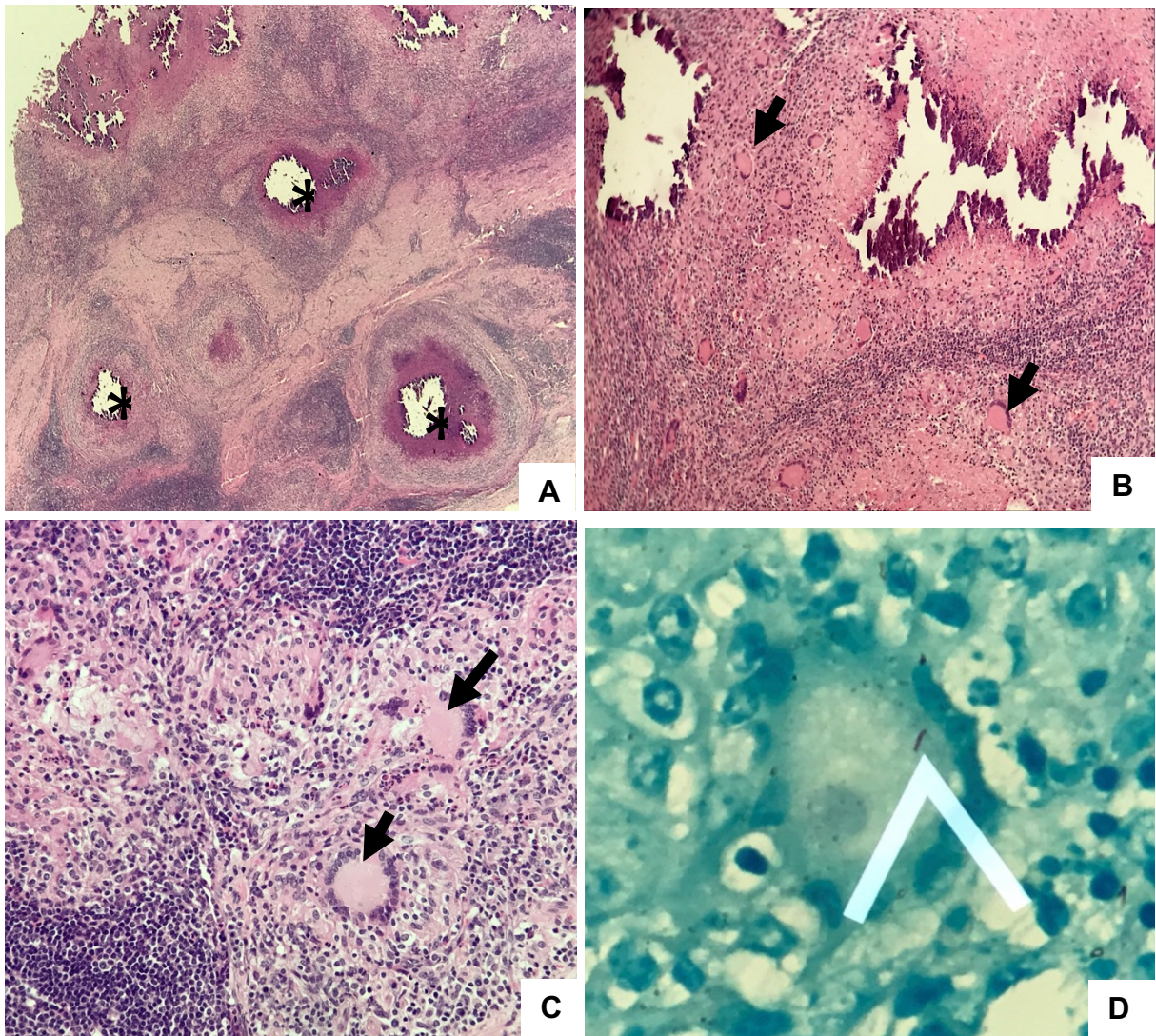
A tuberculose é uma doença infectocontagiosa crônica que é causada por bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR). A doença tem como característica macroscópica principal a formação de granulomas que são conhecidos como tubérculos. Essas lesões são circunscritas e podem ser encapsuladas. Podem ter de 0,1- 4,0 cm de diâmetro, têm aspecto caseoso e podem ter pontos de mineralização. As lesões podem ocorrer nos pulmões e são frequentes nos linfonodos relacionados com o sistema respiratório, principalmente os linfonodos retrofaríngeos, bronquiais e mediastínicos. Se o agente se disseminar na circulação, os granulomas serão encontrados em outras partes do organismo, caracterizando a tuberculose miliar.

Características Histológicas da Lesão Granulomatosa

Na coloração de Hematoxilina e Eosina as lesões granulomatosas são caracterizadas por uma área central de necrose, com

material eosinofílico homogêneo. É possível observar áreas de calcificação que se coram de rosa mais intenso e adjacente à área de necrose há a inflamação granulomatosa que é composta por macrófagos, células epitelióides, células de langhans e vários linfócitos. Também é possível visualizar uma proliferação de tecido conjuntivo fibroso que é a tentativa do organismo de isolar a lesão.

FIGURA 4 - Fotomicrografias de linfonodos mediastínicos de bovino com linfadenite granulomatosa. **A-C (Hematoxilina Eosina)** Granulomas formados por área central de necrose caseosa, com mineralização (asteriscos), circundada por infiltrado inflamatório mononuclear, com macrófagos epitelióides e grande quantidade de células gigantes multinucleadas tipo Langhans (setas) e, externamente, por cápsula de tecido conjuntivo fibroso. **(C).** **(D) (Ziehl Neelsen)** Bacilo álcool-ácido resistente no citoplasma de uma célula gigante. **Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária – LPV/LFDA-MG**



6.3.4. Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Origem Animal (MIC)

As atividades do laboratório atendem ao Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) e Programa de avaliação de conformidade físico-química e microbiológica dos produtos de origem animal comestíveis (PACPOA). Esses programas visam garantir que os alimentos comercializados por estabelecimentos com SIF são adequados para a alimentação humana.

O PNCP visa obter a prevalência de patógenos de importância para saúde pública em produtos de origem animal (POA) sob fiscalização federal. O programa visa identificar *Listeria monocytogenes* em POA prontos para o consumo; *Escherichia coli* verotoxigênica em carne bovina in natura e faz o monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella spp.* em carcaças de frangos e perus.

O PACPOA foi criado para verificar o índice de conformidade dos POA, avaliação dos controles de produtos e dos processos realizados pelos estabelecimentos e fornecer dados para o gerenciamento de risco pelo DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal).

As análises seguem um cronograma em que os estabelecimentos são sorteados para enviarem amostras colhidas por fiscais federais. As amostras devem chegar em condições adequadas de conservação, identificação e devem estar com lacre inviolado. A partir do resultado das análises, o SIF toma as medidas cabíveis a cada estabelecimento. Podem ser tomadas medidas cautelares como: apreensão do produto, suspensão ou interdição da linha de produção, recolhimento de produtos no mercado e a emissão de auto de infração para notificação e apuração das irregularidades. Tudo para resguardar a saúde do consumidor. O infrator está sujeito a ações fiscais previstas na Lei 7.889/1989 e Decreto 9.013/2017.

Acompanhou-se as análises de rotina do laboratório desde o preparo das amostras até a leitura dos resultados. Cada matriz possui análises já definidas pelo MAPA, e os parâmetros aceitáveis constam, em sua maioria, na RDC 12.

6.3.5. Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV)

No Laboratório de doenças virais são feitos testes diagnósticos de diversas enfermidades de importância para os animais de produção provocadas por vírus, conforme pode ser visto na tabela 3. São utilizadas oito técnicas principais no LDDV, são elas: imunodifusão em gel de ágar, neutralização viral em cultura de células, ELISA para detecção de antígenos, ELISA para detecção de anticorpos, EITB, isolamento de vírus em células, RT-PCR e PCR.

O LFDA-MG possui laboratório com nível de Biossegurança 4. Neste laboratório as amostras oriundas de animais com suspeita de febre aftosa são recebidas e podem ser manipuladas sem o risco de disseminação do vírus para o meio externo. Lá dentro se seleciona o que será utilizado nos testes realizados no LDDV e no LBM. Estas amostras precisam sair do NB4 sem apresentarem nenhum risco de disseminação do vírus, para isso utiliza-se o trizol para inativar o vírus da febre aftosa, caso ele exista. O trizol também extrai o RNA do vírus da febre aftosa.

O LDDV possui como apoio o setor de cultivo celular e o laboratório de biologia molecular (LBM). No cultivo celular as células são produzidas e encaminhadas ao setor de diagnóstico para realização das técnicas de neutralização viral. E o LBM fica responsável por realizar as técnicas de PCR.

O diagnóstico da febre aftosa possui muita importância dentro do laboratório. No LDDV existem várias técnicas que são destinadas para o diagnóstico dessa enfermidade e dos diagnósticos diferenciais para ela.

TABELA 3- Diagnósticos realizados no LDDV.

	Vírus	Sorologia				Isolamento	Biologia Molecular	
		ELISA	EITB	Neutralização Viral	IDGA		PCR	RT-PCR
1.	Doença de Aujeszky	X		X		X		
2.	Vírus da Diarreia Bovina a Vírus (BVD)	X		X			X	
3.	Herpes Vírus Bovino 1 (HVB1)	X		X		X		

4.	Anemia Infecciosa Equina (AIE)	X			X			
5.	Febre Aftosa	X	X	X		X		X
6.	Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV)			X				
7.	Peste Suína Clássica (PSC)	X				X		X
8.	Mycoplasma mycoides	X					X	
9.	Vírus da Estomatite Vesicular	X		X		X		X
10.	Vírus da Mixomatose					X		
11.	Vírus Vaccinia			X		X	X	
12.	Pestivirus					X		X
13.	Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva em Suínos (PRSS)	X						X
14.	Senecavírus A			X				X
15.	Peste Suína Africana (PSA)	X					X	
16.	Vírus da Febre Oeste do Nilo							X
17.	ORF vírus (Ectima Contagioso)						X	
18.	Parvovírus Suíno						X	
19.	Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDV)							X
20.	Red Sea Beam Iridovirus (RSIVD)						X	
21.	Vírus da Tilápia (TiIV)							X
22.	Parapoxvírus						X	

6.3.6. Laboratório de Doenças Bacterianas (DDB)

O Laboratório de diagnóstico de doenças bacterianas (DDB) do LFDA atua no diagnóstico de tuberculose, clostridiose por *Clostridium botulinum* e brucelose. O Laboratório de Biologia Molecular (LBM) atua em conjunto para fazer o diagnóstico a partir de PCR. O DDB possui nível 3 de biossegurança (NB 3) por manipular bactérias e amostras potencialmente patogênicas para o ser humano. Foi possível acompanhar o procedimento para isolamento de *Brucella* e diagnóstico de tuberculose por PCR.

Diagnóstico de Tuberculose por PCR

O isolamento do *Mycobacterium bovis* é realizado a partir de amostras de tecidos e/ou órgãos com lesões sugestivas de tuberculose ou não. As amostras devem ser enviadas congeladas para análise laboratorial para conservação e quando forem processadas devem ser descongeladas *overnight*. Devem ser manipuladas em cabine de biossegurança classe II e o analista avaliará qual área do órgão recebido irá ser utilizada para o diagnóstico. Geralmente são as áreas com lesão onde é mais provável o isolamento do *Mycobacterium bovis*. O isolamento bacteriológico do *Mycobacterium bovis* requer um longo período para o crescimento das colônias (30-90 dias), por esse motivo só é realizada em casos específicos. Normalmente, após o corte dos tecidos as amostras são enviadas para o LBM para diagnóstico por PCR.

As amostras que saem do DDB para o LBM precisam ser inativadas. Os tecidos a serem analisados são colocados em tubos com tampão e inativados pela adição de proteinase K e pelo Banho Maria a $56,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,5^\circ\text{C}$ graus por processo *overnight*. O processo de inativação também ajuda na extração do DNA do *Mycobacterium bovis*, mas existem outros métodos complementares que estão sendo testados no LFDA para uma melhor extração: Como a utilização de beads metálicas para maceração em equipamento de extração de DNA. Utiliza-se a PCR em tempo real e são sempre utilizados controles negativos e positivos para garantir o funcionamento da técnica. Nas placas para PCR são adicionadas as amostras e o mix para reação próprio para PCR de *Mycobacterium bovis* e em poucos minutos o resultado pode ser acompanhado através dos gráficos que são gerados no computador.

Isolamento de *Brucella*

A *Brucella* pode não gerar lesão nos órgãos infectados. Por esse motivo, no processamento das amostras não é possível selecionar visualmente uma região mais provável de encontrar a bactéria. Então, o tecido é cortado em pedaços bem pequenos e macerado em aparelho Stomacher por 3 minutos com solução salina peptonada. O líquido resultante da maceração é inoculado em placa de ágar triptose (com 5% de soro) e ágar triptose Farrel com o auxílio de um swab. As placas são incubadas por até 14 dias a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em atmosfera contendo 5-10% de CO_2 . Esse método é utilizado para isolamento da cultura primária.

As colônias começam a ser visíveis dentro de 3 a 4 dias e caso a placa esteja muito contaminada com outras bactérias, pode ser feito um isolamento secundário a partir das colônias típicas. As colônias de *Brucella* são brancas, arredondadas, de superfície lisa e convexa. Contra luz as colônias são transparentes e cor de mel. Após identificação das colônias típicas, é feita uma outra inoculação em meio triptose, após o crescimento recolhe-se as colônias e coloca-se em solução salina. Esse material é inativado em Banho Maria durante 1 hora a 60°C e enviado para o LBM para o diagnóstico por PCR. O diagnóstico por PCR acelera muito o diagnóstico, pois as provas convencionais que são feitas para tipificar a *Brucella* são demoradas. O aquecimento das *Brucellas* em Banho Maria é suficiente também para extrair o DNA bacteriano que será utilizado para a reação de PCR. No LBM se utiliza o PCR Multiplex onde é possível utilizar vários primers para uma mesma amostra, possibilitando saber qual espécie de *Brucella* está presente.

Polarização Fluorescente

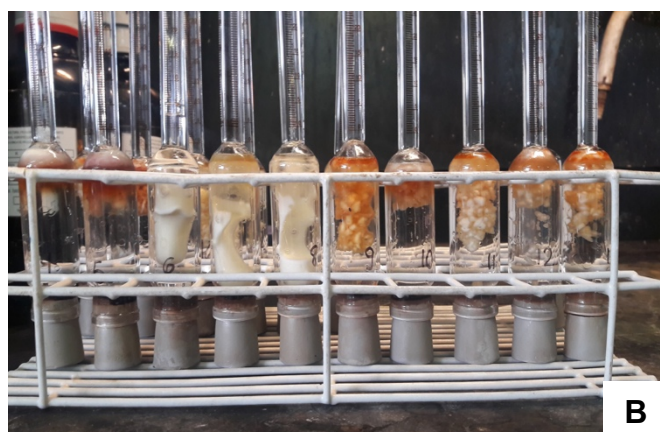
A polarização fluorescente é uma técnica utilizada pelos laboratórios oficiais para o diagnóstico da brucelose. É uma técnica simples que precisa de poucos materiais e é relativamente barata depois da aquisição do equipamento de leitura. No LFDA-MG o aparelho de polarização fluorescente utilizado lê as amostras em tubos de vidro em poucos minutos. É necessário calibrar a máquina antes do uso e utilizar os padrões negativos e positivos antes de iniciar a prova. A interpretação dos resultados se baseia na média dos padrões negativos. Em cada amostra são feitas duas leituras: uma somente do soro com tampão de diluição e outra depois de adicionado o tracer (antígeno conjugado com fluoresceína). A unidade de medida é o mP (unidades de milipolarização).

6.3.7. Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA)

O IQA é responsável por realizar os testes físico-químicos nos alimentos do programa PACPOA. Os resultados das análises são utilizados pelos fiscais para direcionar as ações nos estabelecimentos com SIF. Recentemente, o setor foi fusionado com o setor de análises em alimentos animais. As amostras são coletadas em triplicata e são recebidas duas amostras (prova e contraprova do laboratório) no IQA. A terceira amostra fica como contraprova da empresa e é utilizada caso a empresa queira contestar um resultado insatisfatório. Caso isso ocorra, o responsável da empresa acompanha as análises realizadas na contraprova da empresa no LFDA e a contraprova do laboratório é utilizada como critério de desempate.

As amostras com vencimento próximo têm prioridade para serem analisadas. São conferidos os dados da amostra com a SOA (solicitação oficial de análise) e com as análises preconizadas pelo MAPA para cada tipo de alimento antes de iniciar qualquer análise. Problemas na identificação da amostra e no seu estado de conservação podem inviabilizar o recebimento. Cada funcionário do laboratório é responsável por análises específicas. Foi possível acompanhar o método de determinação de ácido sórbico em alimentos lácteos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, avaliação da porcentagem de líquido em carcaças de frangos congelados (dripping test), determinação de gordura em produtos lácteos por hidrólise básica e gravimetria e determinação da acidez em leite pasteurizado. A figura 6 traz imagens de algumas das análises.

FIGURA 5- (A) Aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (B) Butirômetros para extração de lipídeos em queijo. (C) Dripping Test em carcaças de frango. Fonte: Laboratório de Identidade e qualidade de alimentos. Fonte: IQA/LFDA-MG



6.4. REFERÊNCIAS

ALAWAD, M. F. E. M.; MUSA, M. T. Production and standardization of Brucella national standard antiserum equivalent to OIEISS in Sudan. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e363–e364, 1 mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.430>

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 15, 19 DE FEVEREIRO DE 2004

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 45, 15 DE JUNHO DE 2004

BRASIL INSTRUÇÃO NORMATIVA N°08, 25 DE MARÇO DE 2004

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 41, 8 DE OUTUBRO DE 2009

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA N° 10, DE 3 DE MARÇO DE 2017

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 6, DE 16 DE JANEIRO DE 2018

BRASIL-Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA, 2015

BRASIL-Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA, 2017

BRASIL-Anuário dos programas de controle de alimentos de origem animal do DIPOA, 2018

BRASIL. Plano Brasil livre de PSC. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. –MAPA/ACE, 2019. 57 p.