

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELLEN ELIZABETH LAURINDO

ANÁLISE COMPARATIVA DO SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA
ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA DO BRASIL E DOS
ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA CONSIDERANDO A FORMA ATÍPICA DA
DOENÇA

CURITIBA

2015

ELLEN ELIZABETH LAURINDO

ANÁLISE COMPARATIVA DO SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA
ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA DO BRASIL E DOS
ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA CONSIDERANDO A FORMA ATÍPICA DA
DOENÇA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho

CURITIBA

2015

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “ANÁLISE COMPARATIVA DO SISTEMA DE VIGILÂNCIA DA ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA DO BRASIL E DOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA CONSIDERANDO A FORMA ATÍPICA DA DOENÇA” apresentada pela Mestranda ELLEN ELIZABETH LAURINDO declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Apõe para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 30 de março de 2015

Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Presidente/Orientador

Professor Dr. David Driemejer
Membro

Professor Dr. Luiz Felipe Caron
Membro

“Para todo problema complexo, existe
uma solução clara, simples e errada”
George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, José Carlos e Elizete, dos quais tenho muita admiração, orgulho, respeito e amor, pelas palavras de incentivo e apoio, por toda a dedicação e por me fazer ser a pessoa que sou.

Ao meu irmão Carlos pela compreensão, apoio, amor e amizade todos esses anos.

Ao meu marido Adriano, por todo o apoio e amor.

Agradeço a todos os parentes e amigos que direta ou indiretamente me apoiaram e que vibram com cada conquista minha.

Aos colegas e amigos do Serviço de Saúde Animal da Superintendência Federal de Agricultura do Paraná, pelo apoio, especialmente na minha ausência.

Aos colegas e amigos da Adapar, em especial a Médica Veterinária Elzira Jorge Pierre, pelos ensinamentos e por ser uma “mãezona”.

Aos colegas do Departamento de Saúde Animal do Ministério de Agricultura em Brasília, pela ajuda e pelo fornecimento de informações.

A Dra. Silvia Kreindel, do USDA – EUA, pela ajuda e fornecimento de dados imprescindíveis.

A Dra. Stephanie Czub, do Serviço Veterinário Canadense, pelo fornecimento de artigos científicos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho, pelo apoio e por aceitar o desafio chamado EEB.

Aos professores e colegas de mestrado, em especial a colega Jéssica Formighoni, que sempre me alertava dos prazos dos relatórios.

A todos os outros envolvidos, que de alguma forma colaboraram nessa conquista.

RESUMO

Apesar de atualmente a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) estar sob controle, outras formas da doença foram relatadas inicialmente na Europa, e ainda pouco se sabe sobre seus impactos em Saúde Pública. Por ser uma doença importante no comércio internacional, e ser uma zoonose fatal, a Organização Mundial da Saúde Animal preconiza ações que visam a mitigação do risco de sua difusão pelo mundo. O Brasil e os Estados Unidos da América são países com grandes rebanhos bovinos comerciais, e em ambos só houve a ocorrência de casos atípicos autóctones de EEB. Nesta dissertação foram analisados os sistemas de vigilância da EEB nestes países e foi relatado o primeiro caso de EEB no Brasil, ocorrido no Paraná. Verificou-se que ambos atendem as diretrizes da Organização Mundial de Saúde Animal. Contudo, esta mesma Organização não preconiza ações de prevenção ou controle que tratem especificamente das EEB atípicas, pois o alvo da vigilância são ruminantes com a apresentação do quadro clássico da doença. Neste sentido, há necessidade de um redimensionamento de prioridades e importância para as demais categorias de vigilância (animais mais velhos e caídos). Em relação ao sistema de vigilância brasileiro, pode-se concluir que há necessidade de alterações profundas no sistema de acondicionamento de amostras e exames laboratoriais, pois o atual sistema está voltado para o diagnóstico da forma clássica da EEB, além da inclusão do gânglio trigêmeo, do processo transverso da coluna vertebral e o gânglio da raiz dorsal na lista de materiais de risco específico. Foi possível concluir que o sistema de vigilância da EEB no Brasil é mais voltado para a saúde animal, enquanto o sistema estadunidense visa a proteção do consumidor. As adequações apontadas nesse trabalho são necessárias para que sistema do Brasil atinja um grau de excelência e que forneça mais garantia aos consumidores dos produtos cárneos brasileiros.

Palavras-chave: EEB. Atípicas. Sistema de Vigilância. Mitigação de risco.

ABSTRACT

Although the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) is under control, other forms of the disease have been reported, initially in Europe, and the knowledge about their impact on public health remains uncertain. In compliance with this importance in international trade, the World Animal Health Organization recommends actions aimed at mitigating the risk of spread the BSE around the world. Brazil and the United States are countries with large commercial cattle herds, and in both there was only the occurrence of atypical BSE indigenous cases. In this dissertation, the BSE monitoring systems were analyzed in these countries and the description of the first BSE case reported in Brazil, occurred in Paraná State. We founded that both systems meet the guidelines of the World Organization for Animal Health. However, this same organization does not call for actions to prevent or control that specifically address the atypical BSE, as the target of the surveillance are ruminants with the presentation of the classic picture of the disease. In this sense, is necessary the reassessment of priorities and give more importance to all other surveillance categories (older and fallen animals). Regarding the Brazilian surveillance system, it can be concluded that there is need for profound changes in the packaging system samples and laboratory tests, because the current system is focused on the diagnosis of classical form of BSE, besides adding the trigeminal ganglion, the transverse process of the spine and dorsal root ganglion in the list of specified risk material. We concluded that the BSE monitoring system in Brazil is more focused on animal health, while the US system is aimed the meat consumer protection. The adjustments identified in this work are needed for Brazilian system reaches a level of excellence and to provide more security for consumers of Brazilian meat products.

Keywords: BSE. Atypical. Surveillance System. Risk mitigation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA PRIÔNICA NORMAL PRP ^C (A) E SUA CONFORMAÇÃO ALTERADA (B)..... | 23 |
| FIGURA 2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEMONSTRANDO O PERCURSO DO AGENTE DA SCRAPIE, A PARTIR DO TRATO GASTRO-INTESTINAL, ATÉ O SNC, EM HAMSTER..... | 28 |
| FIGURA 3 – ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DO PRP ^{SC} DA EEB CLÁSSICA E TIPO L E NO ENCÉFALO DE BOVINOS..... | 65 |
| FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DAS BANDAS PARA DIFERENCIAÇÃO DAS EEB CLÁSSICA E ATÍPICAS, PELO EXAME DE WB..... | 75 |
| FIGURA 5 – ESTRUTURA DO PNEEB, CONFORME AS MEDIDAS SANITÁRIAS..... | 92 |
| FIGURA 6 – CADEIA EPIDEMIOLÓGICA DA EEB E AS MEDIDAS DE CONTROLE EM CADA PONTO CRÍTICO DA CADEIA..... | 93 |
| FIGURA 7 – COLHER UTILIZADA PARA A COLHEITA DE TRONCO ENCEFÁLICO DE BOVINOS..... | 101 |
| FIGURA 8 – CASOS DE EEB DIAGNOSTICADOS NO MUNDO, DE 1988 A JANEIRO DE 2015..... | 121 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1 – ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS (EET) EM ANIMAIS E SERES HUMANOS..... | 18 |
| TABELA 2 – TECIDOS BOVINOS CONSIDERADOS DE ALTA INFECTIVIDADE PARA A EEB..... | 30 |
| TABELA 3 - TECIDOS BOVINOS CONSIDERADOS DE BAIXA INFECTIVIDADE PARA A EEB..... | 31 |
| TABELA 4 - DIFERENÇAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS ENTRE A FORMA CLÁSSICA E VARIANTE DA DOENÇA DE CREUTZFELDT-JAKOB..... | 46 |
| TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE vDCJ DIAGNOSTICADOS NO MUNDO..... | 48 |
| TABELA 6 – SUMÁRIO DOS CASOS DE EEB ATÍPICAS DIAGNOSTICADOS EM BOVINOS..... | 55 |
| TABELA 7 – TRANSMISSIBILIDADE DAS DIFERENTES FORMAS DE EEB EM VÁRIOS MODELOS EXPERIMENTAIS, POR INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL..... | 59 |
| TABELA 8 - DETECÇÃO, PELA TÉCNICA DE WB, DE PRP ^{SC} EM AMOSTRAS DE TECIDOS OBTIDOS DE BOVINOS DESAFIADOS COM O AGENTE DA EEB TIPO L..... | 66 |
| TABELA 9 - VALORES EM PONTOS DAS AMOSTRAS PARA VIGILÂNCIA DE ANIMAIS DE UMA SUBPOPULAÇÃO E GRUPO DE IDADE DETERMINADOS..... | 86 |
| TABELA 10 – META DE PONTOS PARA DIFERENTES TAMANHOS DE POPULAÇÃO EM UM PAÍS, ZONA OU COMPARTIMENTO COM ZERO CASOS E 95% DE CONFIANÇA..... | 88 |
| TABELA 11 – ANO DE INÍCIO DAS MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA EEB NO BRASIL..... | 95 |
| TABELA 12 – MEDIDAS DE CONTROLE DE IMPORTAÇÃO DE BOVINOS VIVOS E SEUS SUBPRODUTOS ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB..... | 124 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 13 – TABELA 13 – MEDIDAS DE CONTROLE DA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES (FEED BAN) ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB..... | 125 |
| TABELA 14 – MEDIDAS DE CONTROLE DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB..... | 126 |
| TABELA 15 – MEDIDAS DE CONTROLE EM ESTABELECIMENTOS DE ABATE DE RUMINANTES ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB..... | 127 |
| TABELA 16 - MEDIDAS DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA EEB ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB..... | 129 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAVLD - American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians

APHIS - Animal and Plant Health Inspection Service

AVIC - Area Veterinarian in Charge

BPF – Boas Práticas de Fabricação

BASE- Encefalopatia Espongiforme Amiloidótica Bovina.

CC - Contaminação Cruzada

CGI – Coordenação Geral de Inspeção

CMPAF- Cattle Materials Prohibited in Animal Feed

CMS - Carne Mecanicamente Separada

CWD – Doença Crônica Depauperante

DCJ – Doença de Creutzfeldt-Jakob

DDA – Divisão de Defesa Agropecuária

DIPOA – Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal

EEB – Encefalopatia Espongiforme Bovina

EET – Encefalopatia Espongiforme Transmissível

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ETM - Encefalopatia Transmissível dos Minks

EUA – Estados Unidos da América

FCO – Farinha de carne e ossos

FDA - Food and Drug Administration

FORM-IN - Formulário de Investigação de Doenças – Inicial

FORM-SN - Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica

FR – Federal Regulation

FSIS - Food Safety and Inspection Service

GMC - Gânglio Mesentérico Cranial

GSS - Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

HACCP - Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle

ID₅₀ . Dose Infectante 50%

IFF - Insônia Familiar Fatal

IHQ - Imunohistoquímica

IN – Instrução Normativa

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRE - Material de Risco Específico
NAHLN - National Animal Health Laboratory Network
NMDV - Núcleo Motor Dorsal do Nervo Vago
NSU - National Surveillance Unit
NVSL - National Veterinary Laboratorial Service
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OMS – Organização Mundial de Saúde
PK – Proteinase K
PNEEB – Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina
PRNP - Gene responsável pela codificação da proteína priônica
PrP^C – Proteína priônica celular
PrP^{SC}, PrP^{TSE} ou PrP^{BSE} – Proteína priônica alterada
RGD - Raiz do Gânglio Dorsal
SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária
sDCJMV2 - Subtipo de DCJ esporádica
SIE – Serviço de Inspeção Estadual
SIF – Serviço de Inspeção Federal
SIM – Serviço de Inspeção Municipal
SNAp - Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático
SNAs - Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNC – Sistema Nervoso Central
SNE - Sistema Nervoso Entérico
SVO - Serviço Veterinário Oficial
TgBov XV - Camundongo transgênico para o PrP bovino
TgOv – Camundongo transgênico para o PrP ovino
UE - União Europeia
USDA - United States Department of Agriculture
vCJD – nova variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob
VS - Veterinary Services
WB - Western blot
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| Capítulo 1: Revisão Bibliográfica sobre a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) clássica e atípicas..... | 17 |
| 1.1 A doença..... | 17 |
| 1.2 A EEB como epidemia..... | 19 |
| 1.3 O agente causal..... | 21 |
| 1.4 Transmissão..... | 24 |
| 1.5 Patogenia da EEB..... | 26 |
| 1.6 Sinais Clínicos..... | 31 |
| 1.7 Diagnóstico..... | 34 |
| 1.8 Medidas de Controle..... | 37 |
| 1.8.1 Proibição da alimentação de ruminantes com alguns subprodutos de origem animal (<i>feed ban</i>)..... | 38 |
| 1.8.2 Proibição do consumo de animais doentes e remoção do material de risco específico (MRE)..... | 39 |
| 1.8.3 Vigilância Epidemiológica..... | 40 |
| 1.8.4 Controle de subprodutos e importação de animais vivos..... | 43 |
| 1.9 EEB como zoonose..... | 44 |
| 1.9.1 Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ)..... | 44 |
| 1.9.2 Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ)..... | 44 |
| 2. Encefalopatia Espongiforme Bovina atípica..... | 49 |
| 2.1 Agente Causal..... | 49 |
| 2.2 Epidemiologia..... | 54 |
| 2.3 Transmissão e Patogenia..... | 58 |
| 2.4 Sinais Clínicos | 69 |
| 2.5 Diagnóstico..... | 72 |
| 2.6 Desafios para o controle..... | 75 |
| 3 DESCRIÇÃO DO CASO BRASILEIRO..... | 80 |
| Capítulo 2: Descrição do Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB no Brasil e nos Estados Unidos..... | 83 |
| 4 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB segundo a OIE..... | 83 |
| 4.1 Vigilância epidemiológica para EEB..... | 84 |
| 5 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB no Brasil..... | 91 |
| 5.1 Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (PNEEB)..... | 92 |
| 5.1.1 Controle da importação e monitoramento de bovinos importados... .. | 95 |
| 5.1.2 Subprograma de vigilância..... | 96 |
| 5.1.3 Subprograma de controle em estabelecimentos de abate de ruminantes..... | 98 |
| 5.1.3.1 Remoção do material de risco específico..... | 99 |
| 5.1.3.2 Vigilância em bovinos encaminhados ao abate de emergência.... | 100 |

| | |
|---|------------|
| 5.1.4 Subprograma de controle em estabelecimentos processadores de resíduos de origem animal..... | 101 |
| 5.1.5 Subprograma de controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos que fabriquem e de produtos veterinários para uso em ruminantes..... | 102 |
| 5.1.6 Subprograma de controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos de criação de ruminantes..... | 103 |
| 6 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB nos Estados Unidos.... | 104 |
| 6.1 Controle de importação de bovinos vivos e seus subprodutos..... | 106 |
| 6.2 Proibição da utilização de proteína de mamíferos na alimentação de ruminantes (<i>feed ban</i>)..... | 106 |
| 6.3 Controle e tratamento de subprodutos de origem animal..... | 107 |
| 6.4 Controle nos estabelecimentos de produção de alimentos para ruminantes..... | 108 |
| 6.5 Remoção e destruição de materiais de risco específico (MRE)..... | 110 |
| 6.6 Programa de Vigilância Epidemiológica da EEB (<i>BSE Surveillance Program</i>)..... | 111 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 120 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 130 |
| 9 REFERÊNCIAS..... | 132 |
| 10 ANEXO I | 160 |
| 11 ANEXO II | 165 |
| 12 ANEXO III..... | 167 |

1 INTRODUÇÃO

A Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), comumente conhecida como “Doença da Vaca Louca”, é uma doença degenerativa fatal e transmissível do Sistema Nervoso Central (SNC) de bovinos, com longo período de incubação (média de 5 anos), diagnosticada pela primeira vez em 1986 na Europa. É caracterizada clinicamente por alterações comportamentais, como reações exageradas a estímulos externos e dificuldade de locomoção, e tem curso fatal.

O agente causador da EEB é denominado príon, uma proteína encontrada principalmente no tecido nervoso de animais afetados, e a principal via de transmissão é por meio da ingestão de alimentos contendo farinhas de carne e ossos provenientes de carcaças infectadas.

Desde 1987, quando a EEB surgiu de forma epidêmica como uma nova doença nos rebanhos bovinos, várias ações de controle foram tomadas. Esse grande esforço pode ser devido ao impacto econômico causado por essa doença, resultando em restrições sanitárias e a perda da credibilidade nos produtos de ruminantes e, posteriormente, pela descoberta do seu caráter zoonótico.

A restrição da alimentação de ruminantes com subprodutos de origem animal e a remoção e destruição dos materiais de risco específico (MRE) para a doença das carcaças em frigoríficos se mostraram efetivas para o controle da doença, além da redução da exposição humana ao agente.

No entanto, apesar de atualmente a EEB estar sob controle, outras formas da doença estão sendo diagnosticadas durante as ações de vigilância da doença em sua forma clássica (EEB clássica). Recentemente, EEB atípicas foram relatadas na Europa, e ainda pouco se descobriu sobre essas formas, e quais seriam os seus impactos em Saúde Pública.

Desde o início da epidemia de EEB na Europa, as autoridades sanitárias brasileiras vêm adotando medidas para evitar o aparecimento da doença no país, assegurando a inocuidade dos seus produtos de origem animal perante a EEB, e mantendo a confiabilidade dos mercados internos e externos. Assim, as medidas de mitigação de risco para a EEB estão focadas basicamente no controle da importação de ruminantes, produtos e

subprodutos, controle de produtos utilizados na alimentação animal, vigilância epidemiológica na população de risco e difusão e capacitação dos profissionais ligados à vigilância da doença.

Durante a realização das ações de vigilância epidemiológica na população de risco no Estado do Paraná, diagnosticou-se a primeira ocorrência de EEB no Brasil. O caso refere-se a uma vaca nativa, com aproximadamente 13 anos de idade, da raça Nelore (*Bos indicus*) criada para produção de bezerras para engorda. Esta ocorrência foi reportada a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) em 7 de dezembro de 2012 e, após a notificação, várias ações foram realizadas pelo serviço veterinário oficial buscando elucidar as possíveis causas da doença, além das ações de saneamento. A vigilância epidemiológica concluiu que se tratava de um caso atípico da doença, o que foi reforçado após a análise mais aprofundadas da amostra de SNC encaminhada ao laboratório de referência mundial para a EEB, em Weybridge, Inglaterra.

Durante a investigação epidemiológica e saneamento do foco, observou-se a necessidade de aprimoramento, atualização e revisão do atual sistema brasileiro de vigilância da EEB, pois o mesmo não prevê a ocorrência de casos atípicos.

Os Estados Unidos reportaram o primeiro caso de EEB em 2003, em bovinos importados do Canadá. Até o presente momento, foram notificados 22 casos de EEB naquele país, mas apenas três casos foram de animais nascidos nos EUA (casos autóctones).

Observou-se que, com exceção dos casos detectados em bovinos importados do Canadá, todos os casos foram diagnosticados como sendo a forma atípica da doença.

Considerando as dimensões continentais do Brasil e dos EUA (8,5 e 9,8 milhões de km², respectivamente), da expressividade de seus rebanhos bovinos (209 e 89,9 milhões de cabeças) e o fato de ambos os países terem notificados somente casos autóctones de EEB atípica, esse estudo objetiva melhorar o Sistema Brasileiro de Vigilância para a doença através da comparação com as ações realizadas pelo Sistema de Vigilância dos EUA, considerando que esse país detém um dos melhores status sanitário animal do mundo.

Desta forma, inicialmente é apresentada, no Capítulo 1, uma revisão bibliográfica sobre as EEB clássica e atípicas, com a descrição da doença e do agente, transmissão, patogenia, sinais clínicos, diagnóstico, medidas de controle e caráter zoonótico. A seguir, haverá a descrição do primeiro caso brasileiro de EEB e ações de investigação. Posteriormente, no Capítulo 2, são descritas as recomendações da OIE para os sistemas de vigilância para a EEB no mundo, o Sistema de Vigilância para a EEB do Brasil e dos Estados Unidos, com a descrição das principais medidas de mitigação de risco implementadas e principais normativas sobre a doença nestes países.

Por fim, é realizada uma análise comparativa dos Sistemas de Vigilância da EEB de ambos os países, buscando investigar se estão adequados considerando as novas formas atípicas da doença.

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica sobre a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) clássica e atípicas

Encefalopatia Espongiforme Bovina clássica

1.1 A doença

A Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), ou BSE (sigla para *Bovine Spongiform Encephalopathy*) pertence ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET), também conhecidas como doenças priônicas. São causadas por agentes chamados príon, uma proteína com conformação alterada e com potencial infeccioso, podendo ter origem espontânea (esporádica), genética (familiar) ou infecciosa (WEISSMANN, 1996; PRUSINER, 1998 & HORIUCHI E CAUGHEY, 1999).

Dentre as EET mais conhecidas, tem-se a scrapie em ovinos e caprinos, Doença Crônica Depauperante (CWD) em cervídeos norte americanos, Encefalopatia Espongiforme Felina e a Encefalopatia Transmissível do Mink (ETM) (YASUDA & SCAFF, 2004). Fazem parte deste grupo as EET humanas como a Doença de Creutzfeldt-Jacob (DCJ), a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), a Insônia Familiar Fatal (IFF) e *kuru*, conforme TABELA 1.

Todas são doenças neurodegenerativas transmissíveis, caracterizadas pela ausência de resposta imunológica (BERG, 1994) e que invariavelmente levam a morte após um longo período de incubação (ANDERSON et al., 1996). Morfologicamente, elas são caracterizadas por alterações espongiformes no Sistema Nervoso Central (SNC) (WELLS et al., 1995; WOOD et al., 1997), mas em algumas EET o agente pode ser encontrado no tecido linfóide ou outros órgãos (OESCH et al., 1985).

| Espécie/Doença | Ano do primeiro relato | Etiologia/Transmissão | Referência |
|--|------------------------|-----------------------------------|--|
| Bovinos | | | |
| EEB clássica | 1987 | Alimentação | Wells et al., 1987 |
| EEB tipo H | 2004 | Desconhecido | Biacabe et al., 2004 |
| EEB tipo L (BASE) | 2004 | Desconhecido | Casalone et al., 2004 |
| EEB atípica sem classificação | 2012 | Desconhecido | Seuberlich et al., 2012 |
| Cervídeos | | | |
| Doença Crônica Depauperante (CWD) | 1980 | Transmissão natural | Williams et al., 1980 |
| Felídeos | | | |
| Encefalopatia Espongiforme Felina | 1990 | Alimentação | Wyatt et al., 1990 |
| Caprinos | | | |
| Scrapie Clássica | 1942 | Transmissão natural | Chelle et al., 1942 |
| Scrapie Atípica | 2007 | Desconhecido | Seuberlich et al., 2007 |
| EEB clássica | 2005 | Alimentação | Eloit et al., 2005 |
| Humanos | | | |
| Doença de Creutzfeldt-Jacob | 1920 | Esporádica, genética, iatrogênica | Creutzfeldt et al., 1920 |
| Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) | 1936 | Genética | Gerstmann et al., 1936 |
| Kuru | 1958 | Alimentação (canibalismo) | Gadjusek et al., 1958 |
| Insônia Familiar Fatal (IFF) | 1986 | Genética, esporádica | Lugaresi et al., 1986 |
| vCJD (variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob) | 1996 | Alimentação | Will et al., 1996 |
| Mink | | | |
| Encefalopatia Transmissível do Mink | 1947 | Alimentação | Burger et al., 1965 Hartsough et al., 1965 |
| Ovinos | | | |
| Scrapie clássica | 1732 | Transmissão natural | Leopold et al., 1750 Schneider et al., 2008 |
| Scrapie atípica | 1998 | Desconhecida | Benestad et al., 2003 |

TABELA 1 – ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS (EET) EM ANIMAIS E SERES HUMANOS
FONTE: Adaptado de Seuberlich e colaboradores (2010)

Uma das principais características das EET é o período de incubação longo, onde não há alteração clínica visível. Para a EEB esse período pode variar, em 95% dos casos, entre 2 a 8 anos, com média de cinco anos (ANDERSON et al., 1996), e é, invariavelmente, fatal (KIMBERLIN, 1993).

Pelo fato do período de incubação ser de vários anos, a doença normalmente ocorre em bovinos adultos, em média de 5 a 6 anos e, na época de sua descoberta, observou-se que a doença era mais comum em bovinos leiteiros (NATHANSON et al., 1997).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos após o aparecimento dos primeiros casos de EEB apontaram a via oral como a principal forma de transmissão do agente, pela ingestão de alimentos contendo de carcaças de animais positivos (WILESMITH et al., 1988).

Os sinais clínicos mais característicos são alterações de temperamento e comportamentais (coices e relutância a entrar em locais fechados), hipersensibilidade aos sons e toques, bruxismo e estado de alerta constante (apreensão) (BRAUN et al., 1998a). No entanto, os sinais podem variar consideravelmente, chegando a ser inespecíficos como baixo escore corporal, perda de peso crônica e redução da produção leiteira (DOHERR et al., 1999). Os sinais variam de acordo com a região cerebral afetada pela doença (SAEGERMAN et al., 2004).

Além das perdas econômicas representadas pela morte dos animais, a EEB rapidamente ganhou notoriedade internacional e se tornou uma grande preocupação para a Saúde Pública após a comprovação de seu caráter zoonótico fatal (BRUCE et al., 1997; HILL et al., 1997), causando a Nova Variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob (vDCJ) em seres humanos. Até então, apenas a EEB é a uma doença priônica animal transmissível ao ser humano (WADSWORTH & COLLINGE, 2007).

1.2 A EEB como epidemia

Os primeiros casos de EEB foram observados em 1986 por WELLS e colaboradores (1987) no Reino Unido. As investigações epidemiológicas foram então iniciadas com o intuito de encontrar indícios da causa da doença. Em 1988, Wilesmith e colegas (1988) descobriram que a fonte de infecção era a utilização de farinha de carne e ossos (FCO) contaminada com o agente na alimentação de ruminantes. Atualmente, esta é considerada a forma clássica da doença.

Estudos posteriores mostraram que o início da epidemia surgiu como resultado da infecção que ocorreu provavelmente no inverno de 1981-1982 (COLLEE & BRADLEY, 1997). Para reforçar a ideia de Collee e Bradley, Prince e colaboradores (2003) resgataram SNC de bovinos que estavam armazenados desde 1985, que também resultaram positivos para a EEB.

Alguns fatores que podem ser atribuídos ao surgimento da doença foram as mudanças nos processos de extração da gordura nas graxarias, com mudança do processamento térmico das farinhas e retirada do solvente químico, no início dos anos 1980 (WILESMITH et al., 1991). Existem

comprovações científicas de que os procedimentos utilizados nesses estabelecimentos da União Europeia (UE) naquela época eram incapazes de inativar o agente da EEB, embora pudessem diminuir a infectividade do agente (TAYLOR et al., 1997).

A disseminação da doença para fora do Reino Unido e Europa se deu por meio da exportação de animais vivos e FCO contaminada (HEIM & MUMFORD, 2005).

Vinte anos após sua identificação, a epizootia da EEB está sob controle, contudo, a origem do seu agente causal ainda não é clara (CAPOBIANCO et al., 2007). As hipóteses de origem mais formuladas consideram a mutação genética espontânea em um animal (EDDY, 1995; PHILLIPS et al., 2000) ou a origem a partir de um ovino infectado pela scrapie (WILESMITH et al., 1988). Ambas as hipóteses tem prós e contras, e têm sido discutidas durante muito tempo em vários locais (BROWN et al., 2003).

A hipótese da origem espontânea da doença estava sendo pouco discutida até a descoberta das formas atípicas de EEB em 2004 (CASALONE et al., 2004; BIACABE et al., 2004), que reacendeu a discussão (BROWN et al., 2006). Pela hipótese da origem a partir de formas esporádicas da EEB, um caso atípico de EEB ocorreu no passado e, por contaminação nos alimentos, deu origem a epidemia. Gavier-Widén e colaboradores (2008) ponderam que, para que essa hipótese fosse factível, o agente causal das formas atípicas de EEB deveria ser capaz de se modificar e apresentar as características moleculares do agente da forma clássica.

Nessa linha, e para acender ainda mais as discussões sobre a origem da EEB, um experimento demonstrou que o príon causador da EEB tipo L adquire características do agente da forma clássica, quando inoculado em camundongos não transgênicos (CAPOBIANCO et al., 2007) e transgênicos para o PrP ovino (tgOv) (BÉRINGUE et al., 2007), o que reforça a característica das formas atípicas cruzarem as barreiras inter-específicas e, principalmente, comprova a capacidade de diversificação do príon.

Com menos aceitação no meio científico, a hipótese de Colchester & Colchester (2005) atribuíram a maior ocorrência da EEB no Reino Unido pelo fato deste país ter importado, da Índia, grande quantidade de FCO. Essa

farinha era oriunda da drenagem do rio Ganges, onde culturalmente vários cadáveres humanos são destinados em cerimônias fúnebres. Os pesquisadores afirmaram que essa FCO poderia conter carcaças humanas infectadas com a DCJ, e que quando fornecida na alimentação de bovinos, pode ter desencadeado a epidemia de EEB na Europa.

Shankar & Satishchandra (2005) rebateram essa hipótese, alegando que a Índia notificou apenas 85 casos de CJD humana, em 37 anos (dando uma incidência de 0,08 casos/milhão de pessoas, inferior as demais regiões do mundo). Além disso, no trabalho de Colchester & Colchester, eles estimaram a morte de 150 pessoas por CJD na naquele país, porém Shankar & Satishchandra afirmam que a maioria desses óbitos ocorreu em hospitais, não havendo a destinação desses cadáveres no citado rio.

Com relação ao início da epidemia no Reino Unido especificamente, Anderson e colaboradores (1996) conduziram estudos e observaram que, na década de 70, a FCO era utilizada para a alimentação de animais bem mais jovens em comparação a média de idade de outros países europeus, e depois se descobriu que a infecção pelo agente, pela via oral, se dá principalmente nos primeiros dois anos de vida.

Apesar das incertezas, o conhecimento da origem do agente da EEB é essencial, sendo muito importante para as ações de prevenção a futuros casos da doença nos rebanhos e outros mamíferos, incluindo o homem (CAPOBIANCO et al., 2007).

1.3 O agente causal

Inicialmente, pensava-se que o agente causal das EET era um vírus não convencional, classificado como vírus não convencional de Gadjusek, hoje conhecido como príon (PRUSINER et al., 1982). Príon é uma abreviação para *proteinaceous infectious particle*, partícula proteica infecciosa, descoberta por Stanley Prusiner, e que se refere tanto à proteína celular normal quanto a sua forma anormal (PRUSINER et al., 1982).

A denominação PrP/PrP^C (sendo que o “c” remete a celular normal, para diferenciar da isoforma alterada) é a forma utilizada para expressar a proteína priônica que é encontrada em células saudáveis de diversos tecidos.

Sua produção é elevada nos neurônios e linfócitos, sendo também expressa em células dendríticas e monocíticas (HU et al., 2008).

A função precisa da proteína PrP^C em animais saudáveis ainda é desconhecida. Há algumas evidências que demonstram a função da PrP^C na fisiologia do sono (GAUCZYNSKI et al., 2001), na resistência ao estresse oxidativo (MILHAVET & LEHMANN, 2002) e na auto-renovação das células-tronco hematopoiéticas (OIE, 2010).

Já em animais infectados com EET, a proteína PrP^C tem importância determinante no desenvolvimento da doença, pois camundongos que não expressam essa proteína, não são suscetíveis as EET (BUELER et al., 1993). Estudos posteriores constataram que príons não se propagam em cérebros que não contenham PrP^C (BRANDNER et al., 1996).

Para identificar a forma priônica infecciosa, muitos autores têm utilizado a denominação PrP^{SC}, PrP^{TSE} ou PrP^{BSE} (OIE, 2010). O termo PrP^{SC} foi originalmente utilizado para descrever a porção da molécula PrP que resiste à digestão proteolítica pela proteinase K (PK), nos primeiros estudos de casos de scrapie (SC de scrapie).

Da mesma forma, o PrP^{SC} pode ser também denominado PrP^{RES} (“res” de resistente). Como a porção resistente está estreitamente relacionada com a produção das doenças, o termo tornou-se sinônimo da forma infecciosa do príon em diversas espécies (OIE, 2010). Esta macromolécula (PrP^{RES}) é, até o presente momento, a única proteína infecciosa identificada.

O gene responsável pela codificação do príon é o *PRNP*, que em mamíferos está localizado no braço curto do cromossomo 20, e estudos conduzidos por Dermaut (2008) e Del Bo (2003) mostraram que polimorfismos nesse gene podem aumentar o risco de manifestações precoces do Mal de Alzheimer e acelerar o declínio cognitivo de pacientes portadores da Síndrome de Down, respectivamente. Além disso, mutações nesse gene podem dar origem a síntese do príon patogênico (PrP^{SC}) (YASUDA & SCAFF, 2004).

O príon normal (PrP^C) é estruturalmente dominado pela conformação alfa-helicoidal, ao contrário da sua forma infectante (PrP^{SC}), dominada pela forma beta-folhada (FIGURA 1). A primeira proposta para explicar o

mecanismo de replicação do príon, considerando a ausência de material genético, baseou-se no modelo de auto-propagação, no qual o PrP^C, em contato com o PrP^{SC}, sofre uma desestruturação parcial seguida por uma reestruturação já na conformação PrP^{SC} (PRUSINER et al., 1982).

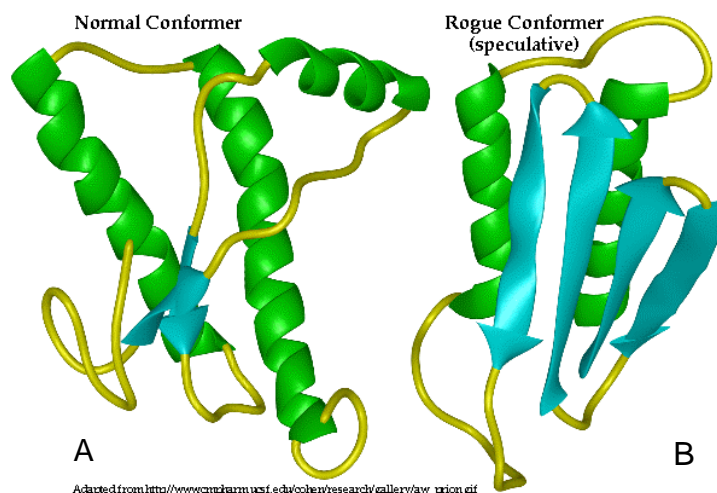


FIGURA 1 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA PRIÔNICA NORMAL PRP^C (A) E SUA CONFORMAÇÃO ALTERADA (B)
 FONTE: University of South Hampton Environmental Health Unit

Em 1996, Collinge e colaboradores descreveram as características eletroforéticas do PrP^{SC} a partir de casos de EEB detectados no campo e casos da vDCJ em seres humanos. Pela técnica molecular de Western blot (WB) o PrP^{SC} causador da EEB em bovinos é caracterizado pela formação de três bandas com massa molecular variando de 18 a 30 kDa, sendo cada banda representada pelas porções monoglicosilada, diglicosilada e não-glicosilada (BIACABE et al., 2004).

Na década de 40, Gordon (1946) demonstrou que o príon causador da scrapie mostrava-se resistente à inativação por formalina; 20 anos depois, Alper e colaboradores (1966) verificaram que o agente também era resistente à ionização e radiação ultravioleta. Mais tarde, com o surgimento da EEB, Taylor (1991) realizou estudos que demonstraram, da mesma forma que para a scrapie, uma alta resistência do príon.

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014) descreve o agente da EEB como altamente estável e resistente ao congelamento, ressecamento e calor de cozimento normal, de pasteurização e de esterilização a temperatura e tempo usuais. O PrP^{SC} mostra-se resistente mesmo quando submetido a grandes variações de pH. As medidas de descontaminação recomendadas

reduzem as quantidades de agente infeccioso, mas podem ser parcialmente ineficazes se o material contiver altas concentrações de agente infeccioso, ou se estiver protegido por matéria orgânica seca (OIE, 2010).

O método de inativação física, recomendado pela OIE, é a autoclavagem de materiais porosos na temperatura de 134 a 138°C durante 18 minutos sob pressão de 2,2bar (porém, a inativação é incompleta). Em relação à resistência a desinfetantes, é sensível ao hipoclorito de sódio (com 2% de cloro disponível) e ao hidróxido de sódio a 2N, desde que aplicado durante mais de uma hora a 20°C para as superfícies e durante uma noite para materiais (OIE, 2010).

Xu e colaboradores (2014) demonstraram que a realização de técnicas de compostagem, utilizando matéria orgânica contendo materiais contaminados com príons, são capazes de reduzir para apenas uma dose infectante (ID₅₀) de PrP^{Sc} a cada 5.600kg de composto final, sendo uma alternativa à esterilização.

Estudos demonstraram que bactérias do gênero *Streptomyces*, *Thermus*, *Bacillus* e *Tritirachium* podem degradar PrP^{Sc} em processamentos de compostagem, por secretarem proteases (LANGEVELD et al., 2003; MCLEOD et al., 2004). A associação de um ambiente altamente alcalino (pH 8 a 10) e temperaturas que chegam a atingir 55°C no centro da compostagem durante semanas ou meses podem dar condições ideais para a desnaturação de proteínas (XU et al., 2010).

1.4 Transmissão

A principal forma de transmissão do agente da EEB é por via oral, pela ingestão de alimentos (principalmente FCO) oriundos de carcaças de animais positivos (WILESMITH et al., 1988). Nessa mesma pesquisa, os autores verificaram que a infecção se dava em bovinos jovens, de até seis meses de idade, quando estes ingeriam alimentos contaminados com o agente. Estudos experimentais também comprovaram a transmissão do agente para bovinos por exposição parenteral a tecidos de animais infectados (WELLS et al., 1998).

Sendo a via oral a principal forma de transmissão, pode-se presumir que há uma redução na concentração do agente infectante, considerando a grande quantidade de alimentos ingeridos diariamente pelos ruminantes. Kimberlin e Wilesmith, em 1994, estimaram que a dose infectante de EEB deve ser 14 vezes superior a DL₅₀, para cada tonelada de alimentos fornecidos numa propriedade. Essa diluição pode ser um fator fundamental que explica a baixa incidência da EEB dentro dos rebanhos (cerca de 3%). Apesar disso, estudos posteriores demonstraram a transmissão oral da EEB em bovinos utilizando 1mg de cérebro positivo (homogeneizado), e que bezerros podem ser infectados com doses ainda menores (WELLS et al., 2007).

Apesar de se observar transmissão vertical na scrapie, sendo uma característica que dificulta o controle dessa doença (PATTINSON et al., 1972), não há evidência dessa transmissão na EEB (ANDERSON et al., 1996; WILESMITH et al., 1997). Contudo, estudos conduzidos por Smith e Bradley (2003) demonstraram que a prole de animais com EEB apresentam maior probabilidade de desenvolver a doença.

Da mesma forma que a transmissão vertical, a horizontal também não foi demonstrada na EEB (WILESMITH et al., 1992). Estudos de Taylor e colaboradores (1995a) demonstraram não haver transmissão do agente pelo leite de vacas positivas. Bradley (1994) e Wathrall (1997) também não obtiveram sucesso na transmissão do agente por meio de embriões e sêmen, respectivamente.

Em bovinos afetados, os tecidos que demonstraram maior infectividade foram o tecido linfóide do íleo distal, medula óssea, gânglio trigêmeo, gânglios e nervos espinhais, medula espinhal, olhos, tonsilas e o encéfalo (WELLS et al., 1998). Estudos recentes sobre a patogenia da EEB demonstraram que a prega ileocecal e o jejuno também apresentam depósitos do agente, assim como porções do músculo semitendinoso e a raiz do gânglio dorsal (RGD), em bovinos na fase terminal da doença (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a).

Estudos demonstraram que pequenos ruminantes, como caprinos e ovinos, são suscetíveis ao agente da EEB e podem se infectar

experimentalmente (FOSTER et al., 2001) ou naturalmente, pela ingestão de FCO contaminada, da mesma forma que os bovinos (ELOIT et al., 2005).

Com relação a outras espécies, Dawson e colaboradores (1990) conseguiram transmitir o agente da EEB para suínos por via intracerebral, demonstrando que eles são suscetíveis à doença, porém não há evidências de sua infecção por via oral (WELLS et al., 2003). Ainda em 1990, um gato doméstico foi diagnosticado com o agente da EEB no Reino Unido, sendo comprovado que sua infecção se deu pelo consumo de ração industrial a base de FCO de bovinos infectados (WYATT et al., 1990). Moore e colaboradores (2011) demonstraram que não há qualquer evidência da transmissão da EEB para galinhas domésticas, mesmo realizando inoculações por via intracerebral e oral.

Somente em 1996 houve a comprovação da transmissão do agente da EEB para seres humanos, pela ingestão de tecidos bovinos infectados, sendo a doença então conhecida como a variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) (WILL et al., 1996). Após esta descoberta, muitos esforços foram emanados, tanto para o conhecimento quanto para o monitoramento e controle da doença (SEUBERLICH et al., 2010).

1.5 Patogenia da EEB

O primeiro estudo sobre a patogenia da EEB foi desenvolvido, nos anos 90, por Wells e colaboradores (1996). Outro experimento utilizando bovinos jovens desafiados por via oral com cérebros positivos para a EEB revelou uma distribuição bem restrita do agente nos animais infectados. A presença do agente foi determinada utilizando provas de Western blot (WB) e Imunohistoquímica (IHQ) em amostras de vários tecidos coletados, e sua infectividade a partir de inoculação em camundongos (WELLS et al., 1998).

Os primeiros estudos realizados em camundongos demonstraram que o agente da EEB já era detectado aos 45 dias após o desafio oral, nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, e aos 90 dias no baço e linfonodos submandibulares. As porções torácica, cervical e lombar da medula espinhal, assim como o encéfalo, resultaram positivas para o PrP^{SC} de EEB

aproximadamente 300 dias após a infecção, com maior deposição do agente na porção torácica (MAGNIEN et al., 1999).

Em bovinos, estudos demonstraram o acúmulo de PrP^{Sc} nas placas de Peyer (HEGGEBO et al., 2000; TERRY et al., 2003; LEZMI et al., 2006) e nas tonsilas palatinas (WELLS et al., 2005), seis meses e 10 meses após o desafio oral, respectivamente. Outro experimento, realizado por Hoffmann e colaboradores (2007), revelou que a difusão do agente da EEB, do intestino para o SNC, segue as fibras nervosas do sistema parassimpático e simpático do Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

Estudos realizados em hamsters (THOMZIG et al., 2004), ovinos (ANDREOLETTI et al., 2004), camundongos (BOSQUE et al., 2002), primatas não humanos (HERZOG et al., 2005) e seres humanos (KOVACS et al., 2005) demonstraram que há uma difusão radial do PrP^{Sc} a partir do SNC para as fibras nervosas menores. Em hamsters, após a infecção oral, o PrP^{Sc} é primeiramente detectado nas placas de Peyer e no sistema nervoso entérico (SNE), seguido pelo gânglio mesentérico cranial (GMC). A partir dele, o agente pode seguir pelas fibras aferentes (sensoriais) ou eferentes (motoras) do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático (SNAp) ou do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAs). A via parassimpática segue pelo nervo vago até o gânglio nodoso e posteriormente ao núcleo motor dorsal do nervo vago (NMDV), localizado no óbex. A via simpática, por sua vez, segue pelo nervo esplâncnico até a medula espinhal torácica e, a partir dela, se espalha para ambas as direções (encéfalo e cauda equina), como mostra a FIGURA 2 (BALKEMA-BUSCHMANN, 2011a).

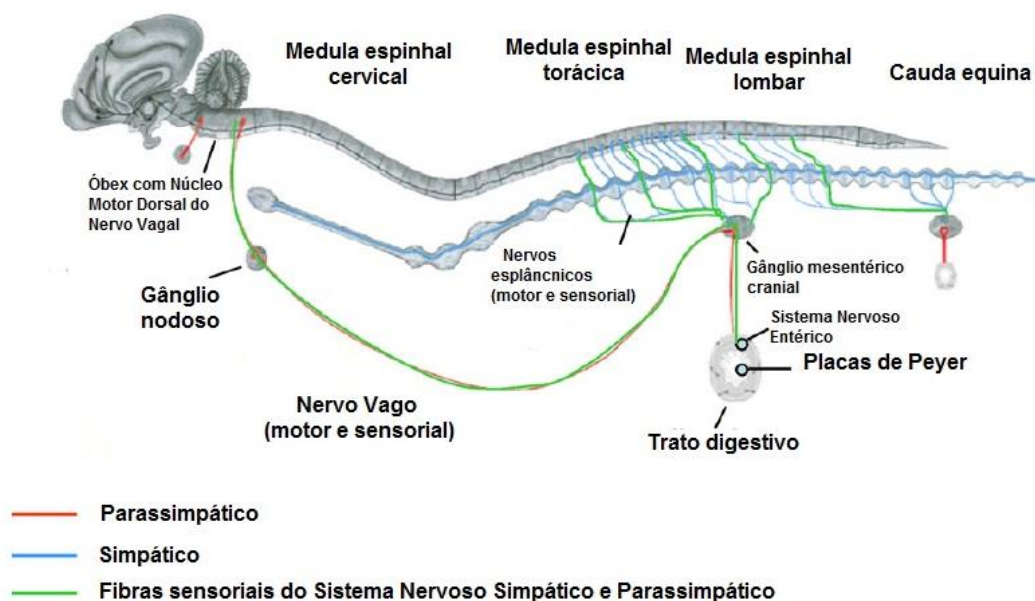


FIGURA 2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DEMONSTRANDO O PERCURSO DO AGENTE DA SCRAPIE, A PARTIR DO TRATO GASTRO-INTESTINAL, ATÉ O SNC, EM HAMSTER

FONTE: Balkema-Buschmann e colaboradores (2011a)

Em inoculação oral em bovinos, Hoffmann e colaboradores (2007) descreveram duas rotas de difusão do PrP^{SC} da EEB envolvendo o sistema nervoso autônomo, do trato gastrointestinal ao SNC: (a) via complexo ganglional celíaco e mesentérico, nervos esplâncnicos e medula espinhal torácica e (b) via nervo vago (inervação parassimpática do trato gastrointestinal). Considerando o envolvimento da raiz do gânglio dorsal, a rota mais provável de difusão é a utilizando os nervos do sistema nervoso autônomo (rota a).

Ainda nesse experimento, ficou evidenciado que a invasão do príon PrP^{SC} na inervação do sistema nervoso periférico não autônomo (como o nervo ciático) é um evento posterior secundário à replicação do agente no SNC (difusão retrógrada) (HOFFMANN et al., 2007).

O achado mais interessante desse estudo foi que em dois, dos 56 bovinos inoculados, observou-se deposição de PrP^{SC} no óxex, sendo que em um deles observaram depósitos também no íleo distal, aos 24 e 28 meses de vida. Demonstrou-se então, pela primeira vez, que os príons da EEB podem alcançar o SNC nos primeiros dois anos de vida do animal, quando de um desafio oral maciço (HOFFMANN et al., 2007). Até aquele momento, essa deposição só tinha sido observada a em bovinos com mais de 32 meses.

Esse achado deve ser levado em consideração durante as discussões sobre a idade limite, tanto para os testes diagnósticos, quanto para a remoção de material de risco específico (MRE).

Em casos clínicos de EEB, estudos já demonstraram o envolvimento do lobo olfatório na patogenia da doença (LEE et al., 2009). Outros estudos sobre patogenia concluíram que não há infectividade do agente na mucosa nasal de animais positivos (WELLS et al., 1998). Apesar disso, a detecção do PrP^{SC} da EEB no bulbo olfatório, em casos terminais da doença, sugere que a via de transmissão olfatória não pode ser excluída como uma rota secundária de infecção, ou até mesmo uma rota de excreção do agente (LEE et al., 2009). Em bovinos na fase terminal da doença, verificou-se a presença de PrP^{SC} no músculo semitendinoso (BUSCHMANN & GROSCHUP, 2005).

Em relação à infectividade, Espinosa e colaboradores (2007) concluíram que a infectividade do agente da EEB está restrito ao SNC, às placas de Peyer e às tonsilas palatinas de animais infectados. Porém, em bioensaios utilizando camundongos TgBov XV, desenvolvidos por Buschmann & Groschup (2005), foi detectada uma baixa infectividade de PrP^{SC} em amostras do músculo semitendinoso desses animais, provavelmente pela presença de fibras do nervo ciático nessa musculatura.

Em 2011, Balkema-Buschmann e colegas (2011a) demonstraram o envolvimento da prega ileocecal e jejuno, além do íleo isoladamente, na patogenia inicial da EEB após exposição oral. Observou-se que o agente, após ser ingerido pelo bovino, acumula-se nas placas de Peyer (em quatro meses após o desafio oral) e posteriormente segue pelas inervações do sistema simpático (nervo esplâncnico) e parassimpático (nervo vago) até alcançar a coluna espinhal torácica, onde há uma difusão centrípeta do agente até a medula espinhal cervical e lombar, e conseqüentemente ao encéfalo pelo tronco encefálico (McBRIDE et al., 2001).

Durante a fase clínica da EEB em bovinos, Buschmann & Groschup (2005) demonstraram que há uma difusão centrípeta da infectividade nas fibras nervosas periféricas, e que a raiz do gânglio dorsal (RGD) da medula espinhal assume papel importante na patogenia e na propagação do agente da EEB, especialmente durante a difusão periférica do PrP^{SC} (ARNOLD et al., 2007; HOFFMANN et al., 2007; MASUJIN et al., 2007).

Assume-se que transmissão do agente para o tecido muscular se dá pelo nervo ciático a partir da medula espinhal nos estágios finais da doença, e que também nesse estágio, a difusão centrífuga do agente ocorre regularmente em todos os tecidos que estão em contato direto com nervos craniais e grandes nervos periféricos (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a).

Em relação ao agente da EEB, a Organização Mundial de Saúde (OMS) categoriza a infectividade dos tecidos baseando-se exclusivamente em observações da doença com ocorrência natural, ou por infecção experimental por via oral em ruminantes (TABELA 2 e 3). São classificados em:

- a) Tecidos de alta infectividade: tecidos do SNC, ou associados anatomicamente ao SNC, altamente infectivos nos estágios avançados das EET;
- b) Tecidos de baixa infectividade: tecidos periféricos que tiveram sua infectividade comprovada ou onde se detectou a presença do PrP^{Sc};
- c) Tecidos sem infectividade detectável: tecidos que foram testados e apresentaram resultados negativos nos testes de infectividade ou ausência do PrP^{Sc}.

| Alta Infectividade | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Tecido | Infectividade | Presença de PrP^{Sc} |
| Encéfalo | Sim | Sim |
| Medula Espinhal | Sim | Sim |
| Retina | Sim | Não testado |
| Nervo Óptico | Sim | Não testado |
| Gânglio Espinhal | Sim | Sim |
| Gânglio Trigêmio | Sim | Não testado |
| Glândula Pituitária | Não | Sim |

TABELA 2 – TECIDOS BOVINOS CONSIDERADOS DE ALTA INFECTIVIDADE PARA A EEB
FONTE: OMS (2010)

| Baixa Infectividade | | | | | |
|----------------------------|---------------|-------------------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| Tecido | Infectividade | Presença de PrP ^{Sc} | Tecido | Infectividade | Presença de PrP ^{Sc} |
| Sistema Nervoso Periférico | | | Trato Digestório | | |
| Nervos Periféricos | [Sim] | Sim | Jejuno | Não | Sim |
| Tecidos Linforreticulares | | | Íleo | Sim | Sim |
| Baço | Não | Não | Ceco | Não | Não |
| Linfonodos | Não | Não | Reto | Não testado | Não testado |
| Tonsilas | Sim | Não | Outros Tecidos | | |
| Timo | Não | Não testado | Glândula mamária | Não | Não testado |
| Sistema Reprodutor | | | Pele | Não | Não testado |
| Placenta | Não | Não testado | Tecido Adiposo | Não | Não testado |
| Ovário | Não | Não testado | Coração/Pericárdio | Não | Não testado |
| Útero | Não | Não testado | Pulmão | Não | Não testado |
| Fluídos corporais | | | Fígado | Não | Não testado |
| Líquido Cefalorraquidiano | Não | Não testado | Rim | Não | Não |
| Sangue | Não | ? | Adrenal | (Sim) | Sim |
| Saliva | Não testado | Não testado | Pâncreas | Não | Não testado |
| Leite | Não | Não | Medula Óssea | (Sim) | Não testado |
| Urina | Não | Não testado | Músculo Esquelético | (Sim) | Não testado |
| Fezes | Não | Não testado | Língua | Não | Não testado |
| Trato Digestório | | | Vasos sanguíneos | Não | Não testado |
| Esôfago | Não | Não testado | Mucosa Nasal | Não | Não testado |
| Rume | Não | Não testado | Glândula Salivar | Não | Não testado |
| Abomaso | Não | Não testado | Córnea | Não testado | Não testado |
| Duodeno | Não | Sim | | | |

- () Dados limitados ou preliminares

- [] Infectividade ou presença do PrP^{Sc} determinada exclusivamente por bioensaio em camundongos transgênicos

- ? Interpretação imprecisa

TABELA 3 - TECIDOS BOVINOS CONSIDERADOS DE BAIXA INFECTIVIDADE PARA A EEB
FONTE: OMS (2010)

1.6 Sinais Clínicos

A definição precisa dos sinais clínicos da EEB era necessária para a manutenção da notificação e vigilância da doença. Por esse motivo, a apresentação clínica da EEB clássica foi bastante investigada durante o pico da epidemia no Reino Unido e na Suíça no início dos anos 90 (BRAUN et al., 1999; BRAUN et al., 1997; BRAUN, et al., 1998b; WELLS et al., 1987; WILESMITH et al., 1992a).

Os primeiros sinais clínicos associados à EEB foram relatados no Reino Unido por Wilesmith (1988) que observou distúrbios de comportamento, apreensão, hiperestesia e alterações na coordenação. Estudos posteriores desenvolvidos por Cranwell e colaboradores (1988); Winter e colaboradores (1989) e Wilesmith & Ryan (1992) corroboraram com os achados iniciais de Wilesmith e postularam que os três principais sinais da doença são: distúrbios de comportamento, aumento na sensibilidade e problemas de locomoção. Ao menos um, desses três sinais clínicos principais, foi observado em 97% dos 17.154 casos analisados por Wilesmith

e colaboradores, em 1992. Após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, a condição física do animal piora até sua morte, podendo levar de duas semanas a até seis meses (ARNOLD & WILESMITH, 2004).

A imagem do comportamento alterado, dificuldade de locomoção e hipersensibilidade associada a animais acometidos com a EEB fez com que a doença seja popularmente conhecida como a “Doença da Vaca Louca”. Porém, somente a presença de sinais clínicos nervosos não pode ser precipitadamente atribuída à EEB, pois há varias enfermidades em ruminantes apresentam sinais semelhantes (AUSTIN, 2000).

Braun e colaboradores (1999) realizaram um estudo de avaliação dos sinais clínicos em bovinos como ferramenta para o diagnóstico da EEB. Nesse experimento, verificou-se que alguns bovinos apresentaram, sem qualquer estimulação, sinais de ansiedade, pânico, aumento na salivação, excesso de lambedura no focinho, olhos saltados, bruxismo e ataxia em membros posteriores. Quando submetidos a estímulos sonoros e luminosos, alguns animais saltaram, indicando hiperexcitabilidade.

Apesar da maioria dos sinais de EEB serem considerados agudos, numa grande proporção de casos se observa queda na produção leiteira (60%) e/ou perda de peso apesar da manutenção do apetite (79%) (WILESMITH et al., 1992a; SAEGERMAN et al., 2004).

Austin (2000) criou cinco categorias de sinais clínicos, baseado na observação de casos clínicos a campo, sendo:

a) Primeira Categoria: comportamento alterado.

Essas mudanças psiquiátricas normalmente são os primeiros sinais clínicos que aparecem nos casos, e são muito sutis, passando despercebidos pelos tratadores (AUSTIN et al., 1997a). Alguns sinais particulares incluem: demonstrar medo à presença humana, ter comportamento de agressão defensiva aplicando coices, apresentar nervosismo ao atravessar portas ou obstáculos, demonstrar imobilidade tônica (paralisia), resistência à ordenha, apresentar comportamento agressivo com outras vacas, bruxismo, bocejamento, reação exacerbada sem estímulo aparente.

b) Segunda categoria: sensibilidade alterada.

As alterações sensoriais são características comuns nas EET. Os sinais mais particulares da EEB são: irritação na região sensorial do nervo trigêmeo, envolvendo movimentos do nariz, fricção da cabeça e queixo, espirros, tosses, movimentação excessiva das orelhas e cabeça e reflexos de Flehmen no lábio superior/narina, aumento na sensibilidade cutânea na região torácica, aumento generalizado dos reflexos e percepção visual anormal.

c) Terceira categoria: postura, movimentação e musculatura alterada.

As mudanças posturais incluem: cabeça baixa, cifose torácica, lordose lombar, orelhas assimétricas, paresia, queda, ataxia, hipermetria/dismetria, incoordenação entre os membros dianteiros e traseiros, queda da pelve, facilidade de escorregar, fasciculose, tremor, mioclonias e blefaroespasmos.

d) Quarta categoria: alterações no sistema nervoso autônomo.

Incluem bradicardia, queda na ruminação (AUSTIN & SIMMONS, 1993), alterações na micção e variação na frequência cardíaca (AUSTIN et al., 1997b).

e) Quinta categoria: alteração nas características somáticas em geral.

Seria a fase terminal da doença, incluindo perda de escore corporal, atrofia muscular (especialmente no músculo *Longuissimus dorsis*), redução na produção leiteira, alopecia devido a fricção da cabeça, traumas devido a quedas e coices em objetos fixos e edema subcutâneo.

Segundo Austin (2000), há três problemas que permeiam o diagnóstico clínico da EEB. O primeiro é a grande variedade de manifestações clínicas da doença. Segundo, o longo período de incubação e o fato de ser uma doença crônica. E, em terceiro, o longo período de duração da doença em alguns casos, podendo haver a ocorrência de outras doenças/infecções concomitantes que mascaram o diagnóstico da EEB propriamente. Por essa razão, técnicas laboratoriais que detectem o agente são fundamentais para o diagnóstico final e conclusivo da EEB.

1.7 Diagnóstico

Bessen & Marsh (1994) determinaram que os príons infecciosos causadores das variadas EET apresentam diferentes sítios de clivagem após tratamento proteolítico e perfis de glicosilação, sendo possível diferenciar os tipos envolvidos.

Todos os métodos diagnósticos da EEB são baseados na diferenciação do PrP^{SC} do PrP^C, pela sua resistência a ação da proteinase K, pela presença da conformação da proteína em beta-folha ou pela sua característica altamente hidrofóbica (BUSCHMANN et al., 2006).

De acordo com o Código Zoonosológico Terrestre, da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o diagnóstico das EET em ruminantes envolve testes de triagem, confirmatórios e discriminatórios (SEUBERLICH et al., 2010). Todos os testes validados para o diagnóstico da EEB necessitam de tecido cerebral e não existe um método diagnóstico capaz de confirmar a doença no animal vivo (OIE, 2010).

Os testes de triagem são utilizados nos programas de vigilância ativa da EEB, e os confirmatórios são utilizados para o diagnóstico final, porém nenhum deles é capaz de diferenciar casos clássicos de atípicos, ou mesmo a ocorrência de EEB em pequenos ruminantes. Os testes discriminatórios, por sua vez, foram desenvolvidos para o diagnóstico de EEB em pequenos ruminantes.

A proteína PrP^C tem massa molecular de 27kDa, mas pode ser monoglicosilada (aproximadamente 31kDa) ou diglicosilada (aproximadamente 35kDa). Devido a essa resistência parcial a digestão proteolítica pela proteinase K, apenas a porção aminoterminal do PrP^{SC} se mantém, com peso molecular de 19 kDa. Os sítios de clivagem da proteinase K e o peso molecular das PrP^{SC} variam entre os tipos de EEB e scrapie (HOPE et al., 1999).

Os testes sorológicos são ineficientes para o diagnóstico da EEB, pois não foram detectadas respostas imunológicas específicas nessa enfermidade (OIE, 2010).

A deposição do PrP^{Sc} no SNC representa um evento anterior ao aparecimento das lesões espongiiformes, tanto nas infecções naturais quanto nas inoculações experimentais. Portanto, provas imunohistoquímicas ou moleculares como o Western blot permitem um diagnóstico precoce, antes do aparecimento de sinais clínicos da EEB (CASTELLANI et al., 1996; DeARMOND & PRUSINER, 1996).

a) Testes de triagem

A implantação de uma vigilância ativa para EEB requer testes de triagem rápidos, capazes de testar um grande número de amostras em pouco tempo. Nos últimos dez anos, foram desenvolvidas várias técnicas de Western blot e ELISA com esse propósito, pela Comissão Europeia e pelas autoridades nacionais (EFSA, 2004; EFSA, 2005 e EFSA, 2009). A maioria dos testes envolve, como primeiro passo, a digestão do material pela proteinase K, e posterior detecção imunológica do PrP^{Sc}, para determinar se é positivo para EET. Na vigilância ativa, a amostra de eleição é o tronco encefálico obtido de animais abatidos, retirado pelo forame magno. No laboratório, é feita a amostragem da região do óbex, para processamento. A autólise aparentemente não afeta a performance do exame, porém quando há desintegração do tecido, a identificação das estruturas alvo de vigilância fica prejudicada (CHAPLIN et al., 2002).

b) Testes confirmatórios:

Historicamente, a confirmação de um caso de EET baseava-se na análise histopatológica de lesões compatíveis no tecido cerebral. Nos animais afetados, as alterações espongiiformes e vacuolização neuronal são observadas no tronco encefálico, na altura do óbex (WELLS et al., 1989). No entanto, o exame histopatológico pode ser severamente comprometido devido à autólise do tecido (OIE, 2010). Atualmente, a histopatologia não é a prova de eleição para o diagnóstico das EET, mas continua sendo um exame importante para a caracterização das lesões, além de poder identificar lesões

características em cérebros encaminhados para diagnósticos de outras enfermidades (SEUBERLICH et al., 2010).

Com as crescentes descobertas sobre a PrP^{SC} na patogênese da doença, houve o desenvolvimento de anticorpos específicos, largamente utilizados na detecção dessa proteína priônica. Na metade dos anos 90, as provas de imunohistoquímica (IHQ) e exames de Western blot foram desenvolvidos para detectar a presença do PrP^{SC} nos tecidos (SEUBERLICH et al., 2010).

A IHQ baseia-se na detecção do PrP^{SC} depositados no tecido fixado por formol e embebidos na parafina. Semelhante à histopatologia, os depósitos de PrP^{SC} são maiores na região do óbex, tanto para scrapie quanto para a EEB. A marcação imunoquímica nessas áreas-alvo é a confirmação da doença.

A IHQ tornou-se a prova de eleição para diagnóstico confirmatório devido a sua interpretação ser menos afetada pela autólise, quando comparada com o exame de histopatologia isolado (SCHALLER et al., 1999; SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000; OIE, 2010).

Nos últimos anos, as técnicas de Western blot (WB) estão sendo amplamente utilizadas no diagnóstico das EET (SEUBERLICH et al., 2010). Em 2008, a OIE aprovou o uso do WB como prova a confirmatória de EEB mais conveniente e prática, em combinação com os testes de triagem, porém tanto a IHQ como o WB são considerados testes confirmatórios para a EEB (OIE, 2010).

A detecção de PrP^{SC} pelo WB requer amostras frescas (resfriadas ou congeladas). Essa amostra é homogeneizada e submetida à digestão proteolítica pela proteinase K. O PrP^{RES} é identificado imunoquimicamente por anticorpos específicos. A conformação do WB típica dos casos clássicos de EEB e scrapie é a formação de três bandas (representando as porções de PrP^{RES} não-glicosilada, monoglicosilada e diglicosilada) entre 18 a 30kDa de peso molecular, onde a banda da porção diglicosilada é a mais proeminente quando comparada com a porção monoglicosilada.

Para ser válido para a OIE, o WB confirmatório deverá ser realizado com uma grande quantidade de amostra inicial (4g) e ultracentrifugação após o tratamento com a proteinase K (STACK et al., 1996).

c) Testes discriminatórios

Em pequenos ruminantes, qualquer amostra positiva para EET deverá ser encaminhada para testes discriminatórios. Essa diferenciação é feita através de anticorpos monoclonais que se ligam à porção N-terminal do PrP^{RES}, tanto no WB quanto na IHQ. No caso da EEB, a diferenciação entre os tipos é realizada, até o presente momento, somente pelo WB (OIE, 2010).

1.8 Medidas de Controle

Desde 1987, quando a EEB emergiu como uma nova doença em bovinos, enormes esforços foram feitos para o seu controle pelo mundo. A principal motivação desse esforço é devido ao impacto econômico causado por essa enfermidade, resultando em restrições sanitárias e a perda da credibilidade nos produtos de ruminantes e, posteriormente, pela descoberta do seu caráter zoonótico, causando a variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) (BRUCE et al., 1997; HILL et al., 1997; WILL et al., 1996).

Embora o número de casos de EEB diagnosticados em alguns países foi relativamente baixo, no Reino Unido houve mais de 180.000, ocasionando um medo de uma possível expansão global na mesma proporção. O risco de contaminação humana abalou a confiança dos consumidores em relação a carne bovina e seus produtos, acarretando numa crise econômica em vários setores, principalmente o pecuário (SEUBERLICH et al., 2010). Por essa razão, as autoridades sanitárias implantaram medidas para proteger a saúde humana, que incluíram: a proibição da alimentação de ruminantes com alguns subprodutos de origem animal, proibição do consumo de animais doentes e remoção do material de risco específico, vigilância epidemiológica e controle de subprodutos e importação de animais vivos (SEUBERLICH et al., 2010).

Devido às características da doença, principalmente em relação ao seu longo período de incubação e propriedades incomuns do seu agente causal, levou-se mais de duas décadas para que ela fosse finalmente controlada. Contudo, apesar de atualmente a EEB estar controlada, novas

formas, também chamadas de EEB atípicas, estão sendo diagnosticadas (SEUBERLICH et al., 2010).

Muitos esforços estão sendo emanados para a caracterização dessas formas atípicas, e principalmente para determinar se as medidas de mitigação de risco da EEB clássica são efetivas para as formas atípicas, além de mensurar seu impacto na saúde pública (SEUBERLICH et al., 2010).

As evidências de que as formas atípicas podem ocorrer esporadicamente representam um risco permanente à saúde pública e muitas medidas de mitigação de risco deverão ser mantidas, como a proibição da alimentação de ruminantes com FCO e a retirada do MRE, mesmo com a vertiginosa queda dos casos de EEB clássica. Por essa razão, as medidas de mitigação de risco e as ações de vigilância da EEB devem ser mantidas até que se esclareçam os reais riscos das formas atípicas (SEUBERLICH et al., 2010).

1.8.1 Proibição da alimentação de ruminantes com alguns subprodutos de origem animal (*feed ban*)

A primeira medida de controle adotada, após a descoberta da forma de transmissão da EEB, foi em 1988, inicialmente pelo Reino Unido, que determinou a proibição da alimentação de ruminantes com proteínas da mesma espécie, também conhecido como *feed ban* (DEFRA, 1988). Essa medida não teve efeito imediato devido ao longo período de incubação da doença, ou seja, os efeitos práticos dessa ação só seriam visualizados aproximadamente 5 a 6 anos após o seu início (BROWN et al., 2001).

Assim, como o esperado, em 1992, essa medida reduziu, em média, cerca de 40% dos casos de EEB diagnosticados no Reino Unido (SMITH & BRADLEY, 2003) e, sucessivamente, a incidência da EEB declinou drasticamente com o passar dos anos, tanto no Reino Unido quanto nos demais países que adotaram tal medida (STEVENSON et al., 2005). Apesar disso, somente o *feed ban* provou não ter sido totalmente eficaz, pois casos da doença continuaram a ser diagnosticados em animais nascidos após a introdução dessa medida de controle (SMITH & BRADLEY, 2003; GULDIMANN et al., 2012).

Hoinville e colaboradores (1995) realizaram análises epidemiológicas nos casos diagnosticados após a implantação do *feed ban*, e verificaram que a região que apresentava maior incidência da doença era aquela com intensa criação de suínos. Apesar da proibição do uso de FCO derivada de ruminantes na alimentação desses animais, o mesmo não ocorreu em suínos e aves, pois essas espécies não apresentavam risco de desenvolver a EEB (SMITH & BRADLEY, 2003). Dessa forma, esse estudo conduziu a hipótese de que esses casos pós-*feed ban* poderiam ser atribuídos à contaminação cruzada acidental de rações destinadas à ruminantes com FCO utilizada para suínos e aves.

1.8.2 Proibição do consumo de animais doentes e remoção do material de risco específico (MRE)

Outra medida tomada pelas autoridades sanitárias, visando à proteção da saúde humana, foi a remoção e destruição dos Materiais de Risco Específico (MRE) para a EEB. São considerados Materiais de Risco Específico (MRE) os tecidos ou órgãos que comprovadamente apresentam infectividade para o agente da EEB. Atualmente, essa é considerada a mais importante medida de proteção aos consumidores (SEUBERLICH et al., 2010).

A primeira medida de controle, em relação ao MRE e proteção da saúde humana, foi adotada em 1988 no Reino Unido, com a proibição da destinação, para o consumo humano, de bovinos com sinais clínicos ou positivos para a EEB no Reino Unido (DEFRA, 1988). Dois anos depois, essa proibição já valia para toda a Europa. Ainda em 1989, o Reino Unido iniciou a remoção e destruição de alguns órgãos e tecidos em frigoríficos, as então intituladas Miudezas Específicas de Bovinos (*Specified Bovine Offal* – SBO), que contemplavam o cérebro, medula espinhal, tonsilas, timo, baço e intestino de todos os bovinos abatidos (SMITH & BRADLEY, 2003).

Atualmente, para fins de segurança alimentar e saúde pública, a União Europeia considera MRE para a EEB os seguintes órgãos e tecidos: encéfalo, medula espinhal, tonsilas, íleo distal, raiz do gânglio dorsal, gânglio trigêmeo e olhos (EC, 2001). Pela regulação desta entidade, esses órgãos e

tecidos devem ser retirados das carcaças e destruídos, de forma a não entrarem na cadeia alimentar humana ou animal.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014), sempre quando há a identificação de algum risco de EEB em seus rebanhos, os países devem tomar medidas imediatas para definir o MRE. Com base em estudos que comprovem infectividade pelo agente da EEB, novos tecidos/órgãos devem ser adicionados à lista de MRE, devendo ser removidos e destruídos. Precauções adicionais podem ser tomadas, tais como proibição do consumo de carcaças de bovinos com idade mais avançada.

Apesar da remoção do MRE ser considerada a medida mais eficiente na proteção dos consumidores, alguns estudos mostram que essa lista de materiais deve ser aumentada. Balkema-Buschmann e colaboradores (2011a) propõem que todo o intestino deveria ser considerado MRE e removido de todos os bovinos abatidos (e que só a remoção do íleo, como é feito atualmente, possibilitaria a entrada do agente na cadeia de consumo). Paralelamente, a descoberta que a raiz do gânglio dorsal (RGD) pode acumular infectividade assim como o músculo semitendinoso em casos terminais de EEB a campo são relevantes para a proteção dos consumidores.

Casteleyn e colaboradores (2007) demonstraram, através de análises histopatológicas, que os cortes rostrais, comumente realizados nos frigoríficos para a retirada da língua destinada a consumo humano, conservam porções das tonsilas palatinas e linguais, estruturas que apresentaram infectividade para o PrP^{Sc} segundo estudos de Wells (2005) e Espinosa (2007).

1.8.3 Vigilância Epidemiológica

Os programas de vigilância para a EEB são balizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que é a organização intergovernamental responsável por promover a saúde animal mundialmente. Esta organização dispõe de um Código Sanitário dos Animais Terrestres, que trata das recomendações dessa entidade para a prevenção, controle e erradicação de várias doenças animais, entre elas a EEB (OIE, 2014).

As ações de vigilância visam, principalmente, a detecção de casos de EEB. Da mesma forma, são ferramentas úteis na determinação da prevalência, no monitoramento e na avaliação das medidas de controle da doença num território (OIE, 2014).

Como medida de controle da EEB, a vigilância da EEB teve início em 1988, no Reino Unido, quando se tornou compulsória a notificação de casos da doença naquela localidade. Dois anos depois, a medida foi adotada pelos demais países da Europa (BROWN et al., 2001). Esse foi o passo inicial nas medidas de vigilância, que hoje vão além da simples obrigatoriedade de notificação.

Atualmente, a vigilância da EEB (e das EET, em geral) é, basicamente, dividida em ativa e passiva. A vigilância passiva é aquela desenvolvida pelos atores envolvidos na cadeia produtiva, como tratadores de animais, pecuaristas, médicos veterinários, que deverão notificar casos ou suspeitas de EEB ao Serviço Veterinário Oficial (SVO). A vigilância ativa, por sua vez, é delineada pelo SVO, que determina as populações-alvo da vigilância, qual o tipo de amostra a ser analisada e determina o teste de diagnóstico utilizado. Independente do tipo de vigilância, é necessário um bom suporte laboratorial para o desenvolvimento das ações, pois é fundamental o diagnóstico confiável para qualquer programa de vigilância (SEUBERLICH et al., 2010).

Vigilância Passiva

Baseia-se na notificação de casos a partir do reconhecimento dos sinais clínicos compatíveis com a EEB. Segundo a OIE (2014), são considerados suspeitos de EEB, bovinos acima de 30 meses que:

- a) Apresentam sinais clínicos nervosos e comportamentais compatíveis com a EEB (suspeitos clínicos);
- b) Estão caídos, e que não conseguem se levantar sem ajuda;
- c) São encontrados mortos na propriedade sem causa aparente, ou durante o transporte (*fallen stock*).

Para que a vigilância passiva seja desempenhada plenamente, é preciso que todos os elos da cadeia produtiva bovina (pecuaristas, tratadores

de animais, médicos veterinários, etc.) estejam mobilizados e tenham sensibilidade e motivação para o correto reconhecimento dos sinais clínicos compatíveis com a EEB, enquadrando os animais nas categorias acima e, principalmente, notificando essas ocorrências ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) (OIE, 2014).

Vigilância Ativa

Ao contrário da vigilância passiva, na ativa o SVO realiza ações buscando detectar casos de EEB. Em síntese, a vigilância ativa busca corrigir as possíveis falhas da vigilância passiva. Por outro lado, ela é muito mais onerosa e requer mais infraestrutura do SVO (SEUBERLICH et al., 2010).

As principais ações desenvolvidas pela vigilância ativa da EEB são a realização de testes laboratoriais para a EEB:

- a) Em bovinos acima de 30 meses, encaminhados ao abate de emergência;
- b) Em todos os bovinos acima de 36 meses encaminhados ao abate de rotina, utilizando testes rápidos.

A vigilância ativa em larga escala com a análise do tecido nervoso do rebanho bovino, buscando a presença do PrP^{Sc}, é capaz de avaliar a prevalência de EEB e também assegurar a exclusão de animais positivos da cadeia alimentar humana (GRASSI et al., 2000).

A implantação de testes rápidos em todos os bovinos acima de 36 meses abatidos na Europa é responsável pela identificação da maioria dos casos de EEB neste continente (UE, 2013). Assim, o risco de exposição humana a EEB foi constantemente reduzido, pois as carcaças positivas são retiradas da cadeia alimentar humana (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a).

Por muitos anos, a vigilância das EET no rebanho baseava-se somente na identificação e notificação de suspeitos clínicos pela vigilância passiva. Em 1999, a Suíça foi o primeiro país a aplicar testes de triagem em animais não suspeitos de EEB, animais sadios no abate de rotina e animais pré-clínicos (DOHERR et al., 2001).

Após a implantação da vigilância ativa em todo o mundo, além do aumento da ocorrência da doença, vários países, até então livres, notificaram seus primeiros casos de EEB (BIRD, 2003). Na Europa, essa vigilância foi estendida aos pequenos ruminantes em 2002, e aos cervídeos em 2006. Essas espécies foram expostas a alimentos potencialmente contaminados e são consideradas suscetíveis, experimentalmente, conforme descrito nos trabalhos de Foster (2001) e Dagleish (2008).

Segundo o Relatório de Monitoramento e Vigilância de Ruminantes para as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) na UE, publicado 09 de outubro de 2013 (UE, 2013), em 2012 um total de 4.795.332 bovinos foram testados para a EEB, sendo 4.794.587 amostras oriundas da vigilância ativa. Assim, a vigilância ativa representa 99,98% das amostras analisadas pelo sistema de vigilância europeu. Dos 18 casos de EEB positivos diagnosticados naquele ano, oito foram detectados pelos testes rápidos realizados nos abates de rotina em animais sadios. Os três casos ocorridos nos EUA também foram detectados na vigilância ativa (RICHT et al., 2007; USDA, 2006).

Smith & Bradley (2003) afirmam que o sistema de vigilância passiva implantado na Europa, além de melhorar a vigilância para a EEB pelo uso de um teste em larga escala, também favoreceu a retomada do consumo da carne bovina devido ao conseqüente aumento da confiança do consumidor nesse produto.

1.8.4 Controle de subprodutos e importação de animais vivos

Com relação a subprodutos de bovinos, em especial a farinha de carne e ossos, a OIE preconiza alguns procedimentos visando reduzir a infectividade do agente da EEB e também de outras EET (OIE, 2014).

O controle da importação de bovinos vivos é considerada uma importante medida de prevenção da EEB, especialmente em países que nunca notificaram a doença. Devem ser considerados os países de origem, métodos de criação e alimentação, finalidade das importações, espécies e aptidão dos animais importados e idade de abate dos animais (OIE, 2014).

1.9 EEB como zoonose

1.9.1 Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ)

A Doença de Creutzfeldt-Jakob é uma desordem neurodegenerativa progressiva e invariavelmente fatal, causada por um príon, sendo considerada uma encefalopatia espongiforme transmissível. Sua incidência mundial é de um caso para cada milhão de pessoas. Caracteriza-se por uma encefalopatia em que predominam demência, mioclonias, com óbito ocorrendo geralmente após um ano do início dos sintomas e afetando faixas etárias mais elevadas (acima de 40 anos) (YASSUDA & SCAFF, 2004).

Em cerca de 85% dos pacientes, a DCJ ocorre como uma doença esporádica sem nenhum padrão de transmissão reconhecível. Uma pequena proporção de pacientes (5 a 15%) desenvolve DCJ decorrente de mutações hereditárias nos genes da proteína do príon (BELAY, 1999).

A DCJ pode ser também transmitida de forma iatrogênica, devido a procedimentos médicos como uso de hormônios do crescimento contaminados, transplantes de córnea e dura-máter de indivíduos portadores da doença, instrumentos neurocirúrgicos e eletrodos contaminados (YASUDA & SCAFF, 2004).

1.9.2 Variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ)

Denominou-se variante da DCJ (vDCJ) uma forma ocorrida no Reino Unido, relacionada à epidemia de EEB em bovinos, que ao contrário da forma clássica, afeta predominantemente pessoas jovens com menos de 30 anos de idade, apresentando quadro atípico (WILL et al., 1996).

Histórico e características da doença

Poucas semanas após a identificação do primeiro caso de EEB, autoridades sanitárias manifestaram preocupação sobre o risco de transmissão dos bovinos para seres humanos (BROWN, 1991), e com o avanço da epidemia, uma série de medidas foram tomadas para erradicá-la e evitar tecidos potencialmente infectados entrassem na cadeia alimentar humana.

A primeira Unidade de Vigilância para o monitoramento da DCJ foi criada no Reino Unido em maio de 1990, e três anos mais tarde, essa vigilância foi estendida a vários outros países europeus, coordenados através da UE. Por este meio, esperava-se que qualquer mudança na epidemiologia da DCJ no Reino Unido poderia ser detectada rapidamente, e que a importância dessa alteração poderia ser comparada com a epidemiologia da DCJ na Europa continental (BROWN et al., 2001).

A preocupação com o possível caráter zoonótico da EEB aumentou após a descoberta dessa enfermidade em gatos domésticos (WYATT et al., 1990). A proximidade desses animais com seres humanos aumentou as especulações sobre a quebra da barreira interespécies (BROWN et al., 2001).

No entanto, durante os 10 anos após a identificação do primeiro caso de EEB, os casos de DCJ não aumentaram nos grupos de alto risco, e continuou a ocorrer na população em geral com as mesmas características clínicas e neuropatológicas observadas antes do aparecimento da EEB (BROWN et al., 2001).

A situação parecia estar sob controle até maio de 1995, quando a Unidade de Vigilância do Reino Unido foi notificada de dois casos de DCJ em jovens com 16 (BRITTON et al., 1995) e 18 anos de idade (BATEMAN et al., 1995).

Até dezembro de 1995, a Unidade de Vigilância tinha sido informada de 10 casos suspeitos de DCJ em pessoas com mais de 50 anos de idade. Alguns casos foram atribuídos a DCJ esporádica ou familiar ou alguma outra doença, mas esses dois casos chamaram a atenção das autoridades pela faixa etária dos pacientes, pois a enfermidade é extremamente rara nas faixas etárias abaixo dos 40 anos (MASTERS et al., 1979).

Em janeiro de 1996, foram confirmados mais dois casos de DCJ no Reino Unido, em pacientes jovens, e uma nova apresentação clínica e histopatológica começou a emergir: pacientes jovens, sintomas iniciais psiquiátricos ou sensoriais proeminentes, ataxia proeminente e curso da doença prolongado (BELAY & SCHONBERGER, 2002). Análises genômicas desses casos não demonstraram mutação patogênica, excluindo a possível origem genética. Outra observação relevante, que reforçou a desconfiança sobre o caráter zoonótico da EEB, foi que, em outros países europeus, nenhum dos casos de DCJ em pacientes jovens teve as características clínicas e neuropatológicas semelhantes a dos casos do Reino Unido (BROWN et al., 2001).

Em março desse mesmo ano, um relatório sobre todas essas observações concluiu que essa variante não reconhecida de CJD (vCDJ), que ocorria apenas em pessoas com menos de 45 anos de idade, foi provavelmente devida à exposição ao agente causador da EEB (WILL et al., 1996).

Esta ligação foi reforçada por estudos laboratoriais que demonstraram características biológicas e moleculares idênticas entre isolado de bovinos infectados com EEB e casos humanos de vDCJ (COLLINGE et al., 1996; BRUCE et al., 1997). A TABELA 4 exemplifica as principais diferenças clínicas e patológicas observadas na DCJ clássica e variante.

| Características | DCJ clássica | DCJ variante (vDCJ) |
|--|--|---|
| Idade média de óbito | 68 anos | 28 anos |
| Duração Média da doença | 4 a 5 meses | 13 a 14 meses |
| Sintomas e Sinais Clínicos | Demência; sinais neurológicos precoces | Sintomas psiquiátricos e comportamentais evidentes; diestesia dolorosa; sinais neurológicos |
| Presença de lesões histopatológicas conhecidas como "placas floridas" em exame histopatológico | Raro ou ausente | Presente em grande quantidade |
| Presença do Agente no Tecido Linfoide | Nunca detectado | Detectado |
| Aumento da porção glicosilada na análise do PrP ^{RES} pela técnica de WB | Não observado | Observado |

TABELA 4 - DIFERENÇAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS ENTRE A FORMA CLÁSSICA E VARIANTE DA DOENÇA DE CREUTZFELDT-JAKOB
 FONTE: Adaptado de Belay & Schonberger (2002)

Transmissão

A infecção provavelmente resultou do consumo de produtos cárneos contaminados por tecido nervoso de bovinos infectados. Nesse sentido, a carne mecanicamente separada (CMS) de bovinos provavelmente foi o produto cárneo bovino mais importante na introdução do agente da EEB na cadeia alimentar humana, pois continha resíduos de medula espinhal e gânglios dorsais, e era amplamente utilizada em produtos processados, como salsichas, almôndegas e enlatados (BROWN et al., 2001). O impacto dessa descoberta na indústria pecuária mundial, especialmente na do Reino Unido, foi devastadora.

Epidemiologia

Apesar dos enormes esforços emanados pelo Reino Unido para o controle da EEB, Anderson e colaboradores (1996) afirmaram que aproximadamente 750.000 bovinos infectados com o agente podem ter entrado na cadeia alimentar humana entre 1980 e 1996. Já Donnelly e colaboradores (2002) estimam que esse número seja muito maior, passando de três milhões de bovinos, considerando o Reino Unido e outros países. Estimativas da época apontavam que, considerando essa nova enfermidade e o tempo de incubação de 60 anos, em 2040 haveria mais de 136.000 casos de vDCJ no mundo (GHANI et al., 2000). Embora esses valores sejam expressivos, pouco mais de 200 pessoas desenvolveram a vCJD até 2014, conforme TABELA 5.

| País | Número total de casos primários (número de vivos) | Número total de casos secundários: transfusão de sangue (número de vivos) | Residentes do Reino Unido por período > 6 meses entre 1980-1996 |
|----------------|---|---|---|
| Reino Unido | 174(0) | 3 (0) | 177 |
| França | 27 (0) | - | 1 |
| Irlanda | 4 (0) | - | 2 |
| Itália | 2 (0) | - | 0 |
| EUA | 4 (0) | - | 2 |
| Canadá | 2 (0) | - | 1 |
| Arábia Saudita | 1 (0) | - | 0 |
| Japão | 1* (0) | - | 0 |
| Holanda | 3 (0) | - | 0 |
| Portugal | 2 (0) | - | 0 |
| Espanha | 5 (0) | - | 0 |
| Taiwan | 1 (0) | - | 1 |

* Residiu no Reino Unido 24 dias no período de 1980-1996

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE vDCJ DIAGNOSTICADOS NO MUNDO

FONTE: NCJDRSU (2014)

Ao contrário da epidemia da EEB, os casos de vDCJ apresentaram um aumento modesto nos primeiros seis anos desde a sua descoberta e, depois disso, o número de casos diminuem ano a ano. Essa diferença entre a epidemiologia da EEB e da vDCJ pode ser devida a dois fatos:

- a) Em seres humanos, não há a reciclagem do agente pelo consumo de tecidos infectados como ocorreu no rebanho – o que reduz a velocidade da epidemia;
- b) O número pequeno de casos de vDCJ pode ser devido a baixa exposição humana ao agente, por uma pequena dose infectante, que foi incapaz de superar a barreira interespecífica e promover a infecção.

Apesar do primeiro caso de vDCJ ter sido diagnosticado 10 anos após a descoberta da EEB em bovinos e, durante quase uma década, a população ficou exposta ao risco de infecção do agente pela via alimentar, a implantação precoce de medidas de controle da doença, como a remoção do material de risco específico (Reino Unido, em 1990), contribuiu para a redução da exposição humana ao agente.

Brown e colaboradores (2001) concluíram que, considerando o período de incubação da vDCJ de 10 a 15 anos, é possível que muitas pessoas expostas ao agente da EEB possam estar incubando a doença (vDCJ). Assim, uma potencial transmissão iatrogênica é mais factível que a

transmissão a partir do consumo de produtos cárneos contaminados, considerando a contínua queda nos casos de EEB em bovinos (GHANI et al., 2000).

2. Encefalopatia Espongiforme Bovina atípica

2.1 Agente Causal

Até recentemente, estudos sobre a transmissão a partir de isolados de casos de EEB a campo e casos da vCJD em seres humanos, demonstraram apenas um agente causal (BRUCE et al., 1997). Além disso, todos os PrP^{SC} isolados do campo mostraram peso molecular e perfis de glicosilação semelhantes, utilizando técnicas de WB (GAVIER-WIDÉN et al., 2005). Por estas razões, era amplamente aceito, pela comunidade científica, a existência de apenas uma forma de príon causador da EEB, ao contrário do que se observava na scrapie desde a década de 70 (FRASER & DICKINSON, 1973).

Atualmente, a classificação dos tipos de EEB baseia-se nas propriedades moleculares e bioquímicas envolvidas na determinação do peso molecular do PrP^{SC}. Na técnica de WB, as bandas representando as porções não-glicosiladas dos PrP^{RES} das EEB atípicas apresentam posições diferenciadas, podendo ter pesos moleculares maiores ou menores quando comparados com a clássica (DUDAS et al., 2010). Recentemente uma estratégia de tipificação molecular foi padronizada e validada para a diferenciação de casos clássicos e atípicos (JACOBS et al., 2007).

Os primeiros casos atípicos de EEB foram diagnosticados, quase que simultaneamente, na França e Itália, em 2004. O caso francês, descrito por Biacabe e colaboradores (2004) demonstrou a existência de uma porção não-glicosilada do PrP^{RES} com peso molecular mais alto que o observado na EEB clássica, sendo então classificado como EEB tipo H. Em contraste, o peso molecular da porção não-glicosilada do PrP^{RES} encontrado no caso italiano era menor que o da EEB clássica, sendo classificado como EEB tipo L (CASALONE et al., 2004).

Essas duas formas atípicas de EEB receberam a denominação L e H em referência a essa característica molecular encontrada no exame de WB, onde L refere-se a *lower*, ou seja, menor e H (*higher*), de maior peso molecular (BUSCHMANN et al., 2006).

Neste último caso, exames de IHQ revelaram a presença de placas amiloidóticas, semelhante às observadas em outras EET em seres humanos, como na Doença de Creutzfeldt-Jacob, nova variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob, GSS e kuru, que, até então, nunca haviam sido reportadas em animais. Assim, os pesquisadores italianos também denominaram esse novo fenótipo de doença como Encefalopatia Espongiforme Amiloidótica Bovina (BASE), além da sua classificação molecular: EEB tipo L (CASALONE et al., 2004).

Apesar de o primeiro caso atípico ter sido diagnosticado na França em 2004, um estudo retrospectivo, utilizando material de casos positivos diagnosticados nesse país desde 2001, realizado por Biacabe e colaboradores (2008), revelou que o primeiro caso de EEB tipo H ocorreu, na verdade, no ano 2000. Isso demonstra que as formas atípicas da EEB não são recentes, elas somente não foram devidamente diferenciadas em anos anteriores. O aprimoramento dos diagnósticos moleculares possibilitou a diferenciação e estudo de novas variações do agente da EEB (SEUBERLICH et al., 2010).

Da mesma forma que no tipo H, há indícios que a EEB tipo L já tenha ocorrido em anos anteriores. Apesar de ela ter sido oficialmente descrita por Casalone e colaboradores em 2004, trabalhos anteriores realizados por Wells já demonstravam a existência de placas amilóides em casos positivos de EEB nos anos de 1991 e 1995 (WELLS & WHILESMITH, 1995), porém a ausência de exames de WB inviabilizaram a diferenciação do agente à época.

O aprofundamento de estudos moleculares identificou várias formas de EET até então desconhecidas, tanto em bovinos quanto em pequenos ruminantes. Esses resultados podem ser atribuídos ao aumento da vigilância das EET em todo o mundo, especialmente na Europa (SEUBERLICH et al., 2010). Enquanto a importância dessas formas atípicas está sendo estabelecida, já há questionamentos sobre a sua possível ocorrência, em

outras partes do mundo, incluindo regiões como a Austrália e Nova Zelândia, consideradas livres das EET em animais (BARON et al., 2007a).

Em 2012, Seuberlich e colaboradores (2012a) publicaram um estudo que detectou um novo PrP^{RES}, a partir de dois bovinos positivos para EEB na Suíça. Esse agente apresentou características diferentes das três formas de EEB então conhecidas (clássica, tipo L e tipo H). Essa descoberta foi contestada por Kittelberger (2012) que alegou ser prematuro dizer de que se trata de uma nova forma de EEB atípica, pois a informação sobre esses animais é limitada, além do fato de ambas as amostras estarem severamente autolisadas, o que pode ter alterado a digestão do PrP comprometendo o diagnóstico molecular pelo WB.

Em resposta, Seuberlich (2012b) reitera que estão sendo realizados experimentos de inoculação do agente identificado em camundongos, que poderão elucidar esses questionamentos, porém, até que se tenha esse resultado, não é possível aceitar nem excluir a possibilidade de se tratar de uma quarta forma de EEB atípica. Até o presente momento, não houve publicação dos resultados finais do estudo de inoculação em camundongos.

Ambos os tipos de EEB já foram diagnosticados no mundo todo, em animais idosos, e sua baixa prevalência pode indicar que se trata de formas espontâneas da doença no rebanho (BIACABE et al., 2008).

Uma das características das formas atípicas da EEB é a ocorrência em animais idosos (> 8 anos de idade). O primeiro estudo sobre a epidemiologia das EEB atípicas analisou os casos franceses e demonstrou que a média de idade dos bovinos acometidos pelas formas atípicas (tipo H e L) era de 12 anos (variando entre sete e 18 anos para o tipo L e 8 a 19 para o tipo H), sendo significativamente maior que a média de idade da EEB clássica (média de sete anos, variando entre três e 15) (SALA et al., 2012). Não houve diferença significativa entre as médias de idade de ocorrência das EEB tipo L e H.

Apesar da maioria dos casos ocorrer em animais idosos, houve relatos de três casos, considerados atípicos pelos seus autores, em bovinos com menos de oito anos. O primeiro caso foi relatado no Japão, quando um bovino jovem (23 meses) foi diagnosticado com EEB pelo método de ELISA e WB. No último teste, constatou-se que se tratava de um tipo diferenciado de

PrP^{RES}. Infelizmente, havia pouco material disponível desse animal, e outros testes diagnósticos não puderam ser realizados, como testar sua transmissibilidade em camundongos (YAMAKAWA et al., 2003).

O segundo caso ocorreu em 2004, quando De Bosschere e colaboradores descreveram a ocorrência de EEB em um bovino da raça East-Flemish com 64 meses na Bélgica, cujo agente causal apresentou características eletroforéticas no WB diferentes dos demais casos clássicos (a porção não-glicosilada apresentou uma migração mais lenta no gel). Um estudo posterior realizado na Bélgica, retestou todos os casos positivos de EEB ocorridos em bovinos acima de sete anos de idade, e confirmaram que não houve nenhum caso de EEB tipo H ou tipo L naquele país (DOBLY et al., 2010).

Apesar dos casos ocorridos no Japão e na Bélgica terem sido considerados atípicos, eles ainda não estão classificados no meio científico (DUDAS et al., 2010), então atualmente as EEB só são classificadas em clássica, tipo H e tipo L ou BASE.

O terceiro caso foi diagnosticado na Suíça, por Guldemann e colaboradores (2012), em uma vaca da raça Red Angus de seis anos e meio. Exames moleculares comprovaram de que se tratava de EEB tipo H. Esse animal foi amostrado pelo sistema de vigilância para a EEB, pois se enquadrava na categoria de abate de emergência, e resultou positivo para EEB no exame de triagem no frigorífico. A pouca idade do animal (< 8 anos), associada à localização dos depósitos de PrP^{SC} (restritas ao óbex e tálamo, basicamente) e ausência de lesões histopatológicas, levaram os autores a concluir que a enfermidade estava em seu estágio inicial.

Para muitos cientistas, a hipótese mais aceitável para a origem das EEB atípicas é a forma espontânea, assim como nas doenças priônicas humanas (SEUBERLICH et al., 2010). Essa hipótese é reforçada pela idade avançada dos animais acometidos, sua distribuição geográfica heterogênea e pela ausência de ligações epidemiológicas com outras EEB.

Essas formas atípicas podem refletir um processo natural de envelhecimento e, talvez, tenham algumas características em comum com outras doenças priônicas em humanos como o Mal de Alzheimer (CISSE et al., 2009).

Segundo Baron e colaboradores (2007a), é possível que essas formas atípicas da EEB sejam similares às formas esporádicas da DCJ e de outras doenças neurodegenerativas e, sua ocorrência esporádica pode responder algumas questões sobre a origem de muitas doenças. Além disso, fortes evidências moleculares sugerem que as formas atípicas podem representar formas esporádicas de EEB (BROWN et al., 2006).

Apesar dessas afirmações sobre a origem das EEB atípicas, Seuberlich e colaboradores (2010) consideram prematuro atribuir, a essas doenças, uma origem espontânea, até que se tenham mais estudos sobre as formas de transmissão.

Em vários casos de EEB tipo L e H, houve o sequenciamento do gene PrP buscando identificar alguma mutação que pudesse dar origem a doença, mas, com exceção de um caso detectado nos EUA por Richt e colegas em 2007, não foram observadas diferenças dos casos clássicos (BRUNELLE et al., 2007; BUSCHMANN et al., 2006; CLAWSON et al., 2008). Esse bovino dos Estados Unidos apresentava uma mutação, previamente desconhecida nesta espécie, que era responsável por codificar lisina no lugar do ácido glutâmico no códon 211 (RICHT et al., 2007).

Uma mutação semelhante no códon homólogo em seres humanos é considerada a causa mais frequente para o aparecimento da DCJ (KOVACS et al., 2005). Assim, esse animal potencialmente representa o primeiro caso de EEB de origem genética em bovinos. Trata-se, então, de uma exceção, pois todos os demais casos de EEB atípicas não houve determinantes genéticos (SEUBERLICH, 2010), podendo ser praticamente descartada a hipótese de origem genética das EEB atípicas (BUSCHMANN et al., 2006).

Estudos conduzidos por Larska e colaboradores (2010) indicam uma possível diferença na patogenia e origem das EEB clássica e atípicas devido aos diferentes perfis de expressão genética observados nos encéfalos dos bovinos acometidos, mas nada ficou definido.

Os achados fenotípicos e características do PrP^{SC} da EEB tipo L são semelhantes a um subtipo de DCJ esporádica que ocorre em seres humanos, conhecida como sDCJMV2, caracterizada por uma heterozigose de metionina/valina no códon 129 do gene do PrP (PARCHI et al., 1999). Essa similaridade pode indicar que talvez a sDCJMV2 pode não ser uma doença

esporádica, e sim adquirida pelo consumo de produtos contaminados com a EEB tipo L (BROWN et al., 2006).

2.2 Epidemiologia

A descoberta de formas atípicas da EEB em vários países do mundo sugere claramente que sua ocorrência não está restrita a uma região geográfica (BUSCHMANN et al., 2006). Desde o começo da epidemia da EEB, pouco mais de 50 casos foram considerados atípicos (EEB tipo L e EEB tipo H), detectados em vários países conforme TABELA 6.

Todos os casos, com exceção dos três casos citados acima, ocorreram em animais idosos (entre oito e 20 anos de idade) se comparados com os casos clássicos de EEB (média de 5 a 6 anos). Com exceção do caso atípico diagnosticado na Suíça (SEUBERLICH et al., 2006) e o primeiro caso do Brasil, todos os demais casos foram detectados durante a vigilância ativa da doença.

| País | Idade | Raça | Sinais Clínicos | Neuropatologia | | Caraterização no WB | Referências |
|----------------|-------|-------------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| | | | | Alterações Espongiformes | IHQ | | |
| Itália | 11 | Bruna Alpina Piemontes | Não | Branda | Placas amiloidóticas | L | Casalone et al., 2004 |
| | 15 | | Não | | Placas amiloidóticas | L | |
| Dinamarca | 14 | Charolês | Não | Não Informado | Não Informado | L | Ducrot et al., 2008 |
| Polônia | 12 | Holandesa | Não | Presente | Positiva (sem placas) | L | Polak et al., 2004 |
| | 2 | | Não | | | | |
| Japão | 14 | Japanese Black | Distasia | Severa | Positiva (sem placas) | H | Masujin et al., 2008 |
| | 5,5 | East-Flemish | Não | Não | Negativa | L* | De Bosschere et al., 2004 |
| França | 10 | Cruzamento Industrial Prim Holstein | Não | Não Informado | Não Informado | H | Biacabe et al., 2004 |
| | 15 | | Não | Não Informado | Não Informado | H | |
| | 8 | | Não | Não Informado | Não Informado | H | |
| Holanda | 13 | Holstein | NA | Presente | Positiva (sem placas) | H | Jacobs et al., 2007 |
| Suécia | 12 | Mestiço Charolês | Caído | Não Informado | Positiva (sem placas) | H | Gavier-Widén et al., 2008 |
| Suíça | 19 | Zebu | Típicos de EEB | Típicos de EEB | Positiva (sem placas) | H | Seuberlich et al., 2008 |
| | 6,5 | Red Angus | Não | Não | Positiva (sem placas) | H | Guldimann et al., 2012 |
| Alemanha | 13 | Angus | Não Informado | Não | Positiva (sem placas) | H | Buschmann et al., 2006 |
| | 15 | Holstein-Friesian | Não Informado | Não | Positiva (sem placas) | L | |
| Estados Unidos | 12 | Mestiço Brahman | Caído | Não | Positiva (sem placas) | H | Richt et al., 2008 |
| | 10 | Red Angus | Caído | Não | Positiva (sem placas) | H | |
| Reino Unido | 13 | Friesian | Ataxia | Não Informado | Não Informado | L | Stack et al., 2009 |
| | 11 | Limousin | Não | Não Informado | Placas amiloidóticas | L | |
| | 12 | Limousin | Não | Não Informado | Não Informado | L | |
| | 21 | Hereford | Não | Não Informado | Não Informado | L | |
| | 13 | Galloway | Caído | Não Informado | Não Informado | H | |
| Canadá | 14 | Simmental | Caído/paresia | Não Informado | Não Informado | H | Stack et al., 2009 |
| | 15 | Friesian | Caído | Não Informado | Não Informado | H | |
| Brasil | 16 | Charolês | Caído | Não Informado | Positiva (sem placas) | H | Dudas et al., 2010 |
| | 13 | Nelore | Caído | Não | Positiva (sem placas) | Inconclusivo** | OIE, 2015 |
| Noruega | 12 | Nelore | Não | Não | Positiva (sem placas) | H | OIE, 2015 |
| | 15 | Não Informado | Não | Não Informado | Positiva | H | OIE, 2015 |

* não estão classificados no meio científico (DUDAS et al., 2010)

** com características de EEB tipo H, no exame de WB

TABELA 6 – SUMÁRIO DOS CASOS DE EEB ATÍPICAS DIAGNOSTICADOS EM BOVINOS

FONTE: Adaptado de Brown e colaboradores (2006)

Dados epidemiológicos são fundamentais para se tentar determinar a origem dessas formas atípicas, mas, para isso, são necessários estudos sobre suas prevalências (BIACABE et al., 2008). A implantação da vigilância ativa em todos os bovinos adultos abatidos na Europa, a partir de 2001 viabilizou o estudo de prevalência dessa doença neste continente, podendo utilizar estudos retrospectivos para determinar a frequência de casos de EEB tipo L e H. Mesmo assim, o alcance estatístico de estudos epidemiológicos envolvendo as formas atípicas de EEB ainda é limitado devido ao baixo número de casos e a escassez de informações epidemiológicas sobre eles (SALA et al., 2012).

Na tentativa de determinar a prevalência das EEB atípicas, o estudo de Brown e colaboradores (2006) demonstra que seria necessário testar

4.605.168 animais adultos (acima de sete anos), para garantir, com grau de confiança de 99%, a prevalência de um caso EEB atípicas por milhão de bovinos adultos.

Contudo, não há dados suficientes para se estimar a prevalência das formas atípicas como um todo, como por exemplo, determinação de casos por milhão de animais testados de todas as idades (BROWN et al., 2006). Além disso, há um grande desafio e muito trabalho a ser feito em relação ao conhecimento das formas fenotípicas das EEB atípicas antes da determinação de suas prevalências (BROWN et al., 2006).

A França foi o país europeu que mais testou animais para EEB, representando aproximadamente 30% de todos os animais testados na UE. Pela grande quantidade de material disponível, muitos estudos foram realizados neste país (BIACABE et al., 2008).

Até 2012 nenhum estudo epidemiológico sobre as EEB atípicas havia sido realizado, provavelmente devido ao reduzido número de casos (SALA et al., 2012). Até aquele ano, pouco mais de 60 casos atípicos haviam sido diagnosticados no mundo, e quase a metade deles foram diagnosticados em apenas dois países (França e Polônia), comprometendo o estudo e determinação de prevalência nos demais países.

O estudo pioneiro sobre a epidemiologia das EEB atípicas foi realizado em 2012, na França, e demonstrou que, ao contrário da EEB clássica, as formas atípicas eram mais frequentes em bovinos de aptidão corte quando comparados com os de aptidão leite (81,8% dos casos de EEB tipo H e 83,3% de EEB tipo L foram diagnosticados em bovinos de corte, contra 20,3% de casos de EEB clássica nessa mesma categoria) (SALA et al., 2012).

A frequência estimada da EEB tipo H e tipo L na França é de 0,41 e 0,35 casos por milhão de animais adultos testados, respectivamente, e de 1,9 e 1,7 casos para cada milhão de bovinos acima de oito anos (BIACABE et al., 2008). Já a prevalência estimada nesse mesmo país é de 0,18 e 0,20 casos, respectivamente, para cada 100.000 animais testados acima de oito anos de idade (SALA et al., 2012). Comparativamente, a prevalência da forma clássica da EEB na França é de 2,81 casos para cada 100.000 animais testados acima de oito anos.

Ainda na França, pesquisas realizadas por Biacabe e colaboradores (2008) demonstraram que a incidência de EEB tipo L e tipo H foram constantes ao longo dos anos, e que não estão relacionadas aos casos clássicos da doença. Com relação à apresentação clínica, Biacabe observou que dos 98 casos clínicos de EEB detectados naquele país, entre janeiro de 2001 e julho de 2007, nenhum foi caracterizado como atípico; por outro lado, os 13 casos atípicos detectados nesse período eram animais acima de oito anos que entraram na vigilância por estarem caídos (nove casos) ou no abate de rotina (quatro casos).

Estudos realizados no Reino Unido indicam que o programa de vigilância ativa implantado neste país está detectando um caso de EEB tipo H a cada dois anos (STACK et al., 2009). Já na Alemanha, a frequência dos casos atípicos ainda é desconhecida, porém alguns trabalhos indicam a incidência pode chegar a 5-10% do número total de animais velhos diagnosticados positivos para EEB utilizando testes rápidos (BUSCHMANN et al., 2006). Nos Estados Unidos, estudos sobre a prevalência da EEB clássica reduziu de cinco para um caso por milhão de bovinos adultos, com grau de confiança de 95% (USDA, 2006b).

Tester e colaboradores (2009) concluíram, a partir de estudos sobre a caracterização dos casos de EEB ocorridos bovinos idosos na Suíça, que a prevalência das EEB tipo L e H estão abaixo do nível de detecção determinado pelo programa de vigilância para a EEB neste país.

Ducrot e colaboradores (2008) afirmam que, devido ao número muito baixo de casos, aliado ao viés de investigação das formas atípicas entre os animais testados positivos para EEB, é impossível comparar a prevalência entre os países.

De qualquer forma, independente da determinação de sua prevalência ou incidência, o fato das EEB atípicas não estarem relacionadas aos casos clássicos da doença reforça a hipótese que as essas representam formas esporádicas de EET, porém não é possível nesse momento excluir outras origens (SEUBERLICH et al., 2010).

2.3 Transmissão e Patogenia

Atualmente, as pesquisas sobre a neuropatologia e distribuição do PrP^{SC} da EEB, tanto do tipo H quanto do L, são limitadas (SEUBERLICH et al., 2010). Isso se deve ao fato de não se ter encéfalos e/ou carcaças inteiras oriundas de bovinos positivos disponíveis para estudo pois, na vigilância de rotina (onde normalmente se detecta estes casos), somente a região do óbex é coletada para análise, sendo que as demais partes do encéfalo, bem como a carcaça, acabam sendo destruídas (OKADA et al., 2011).

Com exceção dos dois casos índices de EEB tipo L, diagnosticados na Itália (CASALONE et al., 2004), e dos dois casos de EEB tipo H diagnosticados na Suíça (SEUBERLICH et al., 2006; GULDIMANN et al., 2012), onde todo o encéfalo estava disponível para estudo, os demais casos atípicos apresentaram limitações quanto a caracterização bioquímica do PrP^{RES} em outras regiões cerebrais (TESTER et al., 2009). Além da escassez de material para pesquisas, muitos casos atípicos são oriundos de animais caídos e, normalmente, o tecido coletado desses indivíduos já está em algum estado de decomposição, comprometendo ainda mais estudos sobre patogenia e transmissibilidade (KONOLD et al., 2012).

Buscando aumentar a disponibilidade de material encefálico positivo para PrP^{SC} das formas atípicas de EEB, Konold e colaboradores (2012) realizaram um pequeno estudo utilizando inoculação intracerebral em bovinos, a fim de replicar o agente, visando fornecer material em quantidade suficiente para futuras pesquisas, incluindo desafios orais (que necessitam de maior quantidade de inóculo).

Considerando essas limitações, todo o conhecimento que se tem atualmente sobre transmissão e patogenia das EEB atípicas baseia-se em experimentos realizados por inoculações experimentais, utilizando inóculos a partir de material positivo de bovinos detectados durante as ações de vigilância para a EEB. Porém, modelos experimentais utilizando camundongos, por exemplo, apresentam limitações. Além disso, a maior parte dos experimentos de transmissibilidade utiliza inoculações pelas vias intracerebral e intraperitoneal (pela reduzida quantidade de material biológico positivo), não refletindo as reais barreiras interespecíficas observadas numa infecção oral (SEUBERLICH et al., 2010). Um resumo sobre os estudos já

publicados sobre a transmissibilidade dos agentes das EEB atípicas pode ser visualizado na TABELA 7.

| Agente | Camundongo Comum | Camundongo transgênico PrP ^{SC} | | | | Primata não humano | Bovinos |
|--------------|------------------|--|--------------------|------------|------------|--------------------|--------------------|
| | | Ovino | | Bovino | Humano | | |
| | | PrP ^{VRO} | PrP ^{ARO} | | | | |
| EEB clássica | pos | pos (3) | pos (5) | pos (3) | pos (8)(9) | pos (17) | pos |
| EEB tipo L | pos (1) | pos (4) | pos (5) | pos (6)(7) | pos (10) | pos (7)(11) | pos (6)(13-15)(18) |
| EEB tipo H | pos (2) | pos (4) | neg (5) | pos (4) | neg (8)(9) | NA | pos (13-16) |

Referências: (1) CAPOBIANCO et al., 2007; (2) BARON et al., 2006; (3) BÉRINGUE et al., 2007; (4) BÉRINGUE et al., 2006; (5) BARON et al., 2007b; (6) FUKUDA et al., 2009; (7) COMOY et al., 2008; (8) BÉRINGUE et al., 2008; (9) KONG et al., 2008; (10) MASUJIN et al., 2008; (11) ONO et al., 2011; (12) LOMBARDI et al., 2008; (13) IWAMARU et al., 2010; (14) BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b; (15) KONOLD et al., 2012; (16) OKADA et al., 2011; (17) LASMÉZAS et al., 2001; (18) OKADA et al., 2012.

TABELA 7 – TRANSMISSIBILIDADE DAS DIFERENTES FORMAS DE EEB EM VÁRIOS MODELOS EXPERIMENTAIS, POR INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL

FONTE: Adaptado de Seuberlich e colaboradores (2010)

Apesar da infecção por via oral não ser capaz de definir a virulência dos agentes das EEB (clássica, tipo H ou tipo L) (MANUELIDIS, 2010), seu conhecimento é importante para a definição das medidas de controle da doença. Dessa forma, várias linhas de pesquisa sobre a transmissibilidade das EEB atípicas estão trabalhando com desafios orais, considerando que esta é a via mais importante de transmissão do agente e, conseqüentemente, seu conhecimento é necessário para a prevenção de futuras epidemias. Devido ao longo período de incubação da EEB, há poucos estudos concluídos sobre transmissão oral dessas formas (SEUBERLICH et al., 2010).

Nesse sentido, Dudas e colaboradores (2014) estão desenvolvendo um experimento de inoculação oral em bovinos. Dados preliminares, ainda não publicados, demonstraram sucesso na transmissão oral das EEB atípicas.

Considerando como finalidade o controle de doenças, é importante ter estabelecido, mesmo que só experimentalmente, o potencial de transmissão vertical e horizontal do agente dessas novas formas. Por esse motivo vários experimentos de transmissibilidade estão sendo realizados em camundongos comuns, transgênicos e em outras espécies (SEUBERLICH et al., 2010).

Como resultado, estudos já demonstraram que, assim como o príon causador da EEB clássica, os agentes causadores da EEB tipo L e H também conseguem infectar outras espécies (BÉRINGUE et al., 2007; BARON et al. 2006).

Ainda há poucos estudos que identificaram quais os tecidos infectantes nas EEB tipo L e H. Há necessidade de mais estudos sobre transmissibilidade e análise mais profunda dos tecidos oriundos de casos de campo, mas, para isso, é necessário termos a carcaça inteira do animal positivo (SEUBERLICH et al., 2010).

Sobre a patogenia das EEB atípicas, os primeiros relatos destas doenças já demonstraram que a distribuição do PrP^{Sc} em diferentes regiões do cérebro não seguiam o padrão determinado nos casos de EEB clássica (CASALONE et al., 2004; BIACABE et al., 2004).

O primeiro estudo sobre a patogenia das EEB atípicas foi desenvolvido em 2011(a), por Balkema-Buschmann e colaboradores, que realizaram desafios com os agentes das EEB tipo L e H em bovinos. Devido a pouca quantidade de material positivo disponível para a pesquisa, a inoculação foi apenas intracerebral.

Foram coletadas amostras de diferentes regiões cerebrais, tecidos periféricos do sistema linforreticular, sistema nervoso periférico e tecido muscular, e realizado testes-rápidos para o diagnóstico da EEB. Na análise dos tecidos periféricos, não se verificou diferenças na distribuição do PrP^{Sc} das formas atípicas em relação a EEB clássica, sendo mínima a concentração em todos os tecidos periféricos analisados (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a). Outra pesquisa, realizada por Konold e colaboradores (2012), também não detectou marcação, por IHQ, em nenhum tecido linfoide ou tecido nervoso entérico dos animais desafiados com EEB tipo L e H.

Em relação ao SNC, foram observadas alterações na distribuição do agente das formas atípicas em relação a forma clássica apenas no encéfalo. Konold e colaboradores (2012) realizaram estudos com desafios intracerebrais com agentes da EEB tipo L e H e demonstraram haver maior vacuolização nas regiões rostrais do encéfalo, especialmente no córtex frontal. Nesse último trabalho, observaram-se lesões histológicas em formato de placas na substância branca cortical, com alguns depósitos na neuróplia e cerebelo, nos animais positivos para a EEB tipo L, na prova de IHQ. Nos animais inoculados com a EEB tipo H, observou-se marcações no córtex cerebral, na substância branca da medula espinhal e no cerebelo. Apesar da

distribuição mais rostral do agente no SNC característico nas formas atípicas da EEB, o agente de ambas as formas foi detectado no óbex de todos os animais desafiados.

EEB tipo L ou BASE

A EEB tipo L só conseguiu ser transmitida a camundongos comuns após a segunda passagem, ao contrário do observado com os tipos H e clássico (CAPOBIANCO et al., 2007). Nesses animais, o PrP^{Sc} da EEB tipo L adquire características moleculares e fenótipos neuropatológicos semelhantes a EEB clássica (BÉRINGUE et al., 2006). A existência de mais de um agente associado à EEB e a habilidade do agente causador da EEB tipo L se converter na forma clássica podem ter importantes implicações em relação a origem da EEB em bovinos e EET em outras espécies, incluindo seres humanos (CAPOBIANCO et al., 2007).

Apesar desses achados em modelos experimentais (camundongos), não se observou a conversão do príon em sua forma clássica em inoculações intracerebrais em bovinos (IWAMARU et al., 2010; BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b; KONOLD et al., 2012), mesmo após uma segunda passagem (KONOLD et al., 2014).

Com relação a transmissão em seres humanos, Casalone e colaboradores (2004) demonstraram semelhanças na porção monoglicosilada do PrP^{RES} causador da EEB tipo L e da DCJ esporádica, além de ambos apresentarem placas amiloidóticas no SNC. O pouco envolvimento do núcleo motor dorsal do nervo vago e do tronco encefálico na patogenia da EEB tipo L sugere que a rota de disseminação infecção do agente não se dá pelo trato digestório, indicando se tratar de uma doença de ocorrência esporádica no rebanho (CASALONE et al., 2004).

Um experimento realizado por Béringue e colaboradores em 2008, demonstrou que os camundongos inoculados com a EEB tipo L e a EEB clássica apresentaram lesões histopatológicas distintas, principalmente em relação à localização, sendo que na clássica observou-se a deposição granular do PrP^{Sc} em todo o encéfalo. Já as lesões causadas pela EEB tipo L se mostraram restritas ao núcleo dorsal do tálamo, hipotálamo lateral, na

substância cinzenta da porção superior do colículo e em pequenas porções do tronco encefálico. Outros estudos demonstraram que a deposição do PrP^{Sc} da EEB tipo L atinge as porções mais rostrais do encéfalo, quando comparado com a forma clássica.

Nesse mesmo estudo, Béringue e colaboradores (2008) concluíram que príons da EEB tipo L podem ser transmitidos a camundongos Tg650 PrP humano, sem barreira interespecífica significativa, pois em seu experimento houve 100% de taxa de ataque, além de não haver alterações no perfil eletroforético do PrP após seguidas passagens. Considerando a hipótese da EEB tipo L ter caráter zoonótico, esse estudo ressalta a necessidade de investigações sobre a patogenia desse agente, principalmente em relação ao tropismo por tecidos linfoides.

No mesmo ano, Kong e colaboradores (2008) publicaram um trabalho comprovando que o príon da EEB tipo L tem tropismo por tecidos linfoides quando o agente é inoculado por via intracerebral em camundongos transgênicos para PrP^C humana (observou-se acúmulo de PrP^{Sc} da EEB tipo L no baço dos camundongos infectados). Além disso, o experimento demonstrou que a taxa de transmissão da EEB tipo L é significativamente maior quando comparada com a clássica, sugerindo que aquela forma é a mais virulenta e aparentemente a única com características linfotrópicas para seres humanos.

Apesar disso, estudos posteriores demonstraram que não houve depósito de PrP^{Sc} da EEB tipo L nos tecidos linfoides e linfonodos dos macacos inoculados com esse agente (ONO et al., 2011).

Baron e colaboradores (2007b) conduziram estudos de infecção de camundongos transgênicos para o PrP ovino com a EEB tipo L e o agente da Encefalopatia Transmissível dos Minks (ETM), isolado de um caso de campo detectado nos Estados Unidos no ano de 1985. Como resultado, foi demonstrada similaridade entre o príon causador da EEB tipo L e a ETM, o que fundamenta a hipótese que a ETM pode ter surgido a partir da ingestão de FCO contaminadas com o agente da EEB tipo L.

Lombardi e colaboradores (2008) demonstraram que os agentes causadores da EEB clássica e EEB tipo L mantêm propriedades biológicas

diferentes e causam doenças distintas quando transmitidas ao seu hospedeiro natural (bovinos).

Experimentos de Buschmann e colaboradores (2006) demonstraram que todos os camundongos inoculados com a EEB tipo L (por via intracerebral) desenvolveram sinais clínicos após um período médio de 185 dias de incubação, enquanto o período de incubação foi de 230 dias na clássica.

Capobianco e colaboradores (2007) observaram esse mesmo comportamento em camundongos TgBov inoculados com a EEB tipo L e a forma clássica. Com relação a localização do agente no SNC, verificou-se maior deposição de príons no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo nos camundongos desafiados com a EEB tipo L, diferentemente do observado no grupo controle onde a deposição se deu no tálamo, gânglio basal, óbex e áreas olfatórias. Verificou-se a presença de PrP^{Sc} nos linfonodos cervicais e mesentéricos, baço, timo, fígado, nervos periféricos e na musculatura dos membros pélvicos e torácicos de todos os animais infectados (com a EEB clássica e EEB tipo L).

Uma estratégia para avaliar o risco da EEB tipo L para humanos consiste em avaliar a suscetibilidade de transmissão da doença e seu grau de patogenicidade utilizando primatas não humanos que já sejam comprovadamente suscetíveis à EEB clássica e ao agente da vDCJ (LASMÉZAS et al., 2001).

Dessa forma, Comoy e colaboradores (2008) realizaram inoculações intracerebrais com os príons da EEB tipo L, EEB clássica e da vDCJ em primatas não humanos (*Macaca fascicularis*), comprovando a transmissão desses agentes nesta espécie. Os animais inoculados com o príon da EEB tipo L desenvolveram a doença mais precocemente (21 meses) quando comparados aos desafiados com a forma clássica e com a vDCJ, com tempo de sobrevivência significativamente menor. A análise histopatológica do SNC revelou lesões espongiiformes no córtex frontal e parietal nestes animais, porém em menor intensidade no óbex e cerebelo quando comparado aos animais afetados pela forma clássica, sem a formação de placas amiloides.

Posteriormente, um segundo estudo utilizando inoculação intracerebral do príon da EEB tipo L em macacos, realizado por Ono e colaboradores

(2011) corroborou com os achados de Comoy, principalmente em relação ao reduzido período de incubação e curto tempo de sobrevivência dos primatas. Porém, nesse último estudo, as análises histopatológicas não se restringiram ao SNC. Dessa forma, detectou-se a presença de PrP^{Sc} da EEB tipo L na retina, gânglio trigêmeo e na raiz do gânglio dorsal desses animais. Houve a detecção, porém em menor intensidade, de depósitos de PrP^{Sc} no nervo ciático de um dos animais testados. Entretanto, não se verificou a presença do agente nos tecidos linfóides em nenhum primata desafiado.

Em resumo, todos os experimentos de transmissão da EEB tipo L para camundongos transgênicos humanos (KONG et al., 2008) e primatas (COMOY et al., 2008; ONO et al., 2011) revelam que esse agente é muito mais virulento nessas espécies do que se observa na forma clássica da EEB. Essa característica é uma forte indicação de um alto potencial zoonótico da EEB tipo L, em relação à EEB clássica (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a). No entanto, é necessária a realização de experimentos utilizando a inoculação do agente da EEB tipo L por via oral para uma melhor avaliação da transmissão do agente para seres humanos a partir de produtos de ruminantes infectados (ONO et al., 2011).

Em bovinos, o primeiro estudo de transmissão da EEB tipo L foi realizado em 2008, por Lombardi e colaboradores. Nesse trabalho, foi realizada inoculação intracerebral do príon da EEB tipo L em bezerros. Como primeiro resultado, observou-se que não houve transformação do príon para a sua forma clássica (EEB clássica), como demonstraram os trabalhos em camundongos realizados por Capobianco e colaboradores (2007) e Béringue e colaboradores (2007). Além disso, o período de incubação da doença foi significativamente menor quando comparado à forma clássica.

Ainda nesse estudo, verificou-se que nos bovinos inoculados com o príon da EEB tipo L houve uma maior concentração de depósitos de PrP^{Sc} no córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, com pouca deposição na medula espinhal, diferentemente do que se observa no exame histológico e imunohistoquímico do SNC de bovinos acometidos pela forma clássica (FIGURA 3). Não houve detecção do PrP^{Sc} nos tecidos linfóides de nenhum animal desafiado (forma clássica e tipo L), porém observou-se atrofia

muscular nos músculos glúteo médio, psoas maior, *longuissimus dorsis* e tríceps nos animais inoculados com a EEB tipo L (LOMBARDI et al., 2008).

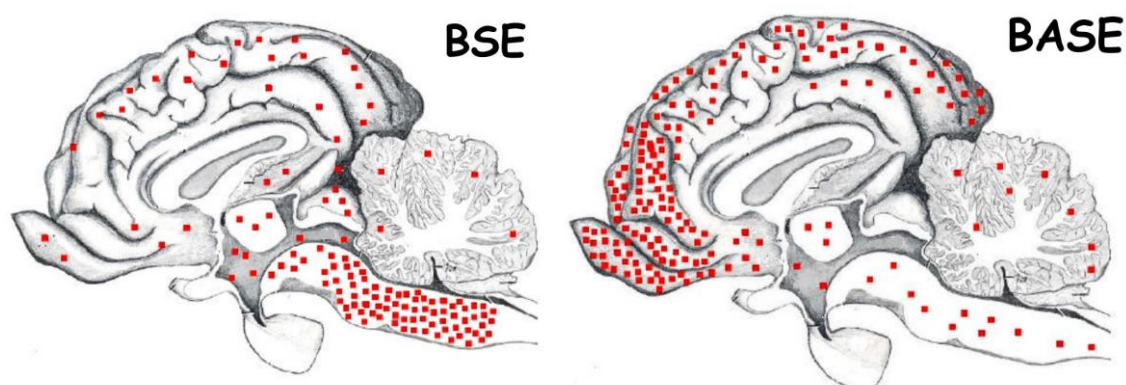


FIGURA 3 – ESQUEMA DA DISTRIBUIÇÃO DO PRP^{SC} DA EEB CLÁSSICA E TIPO L E NO ENCÉFALO DE BOVINOS
 FONTE: CODA/SEVA

Em estudo semelhante, Fukuda e colaboradores (2009) verificaram que bezerros da raça Holstein desafiados com amostras de casos de EEB tipo L por via intracerebral tiveram menor período de incubação da doença, quando comparado ao grupo controle inoculado com o agente da EEB clássica, corroborando os resultados obtidos por Lombardi (2008). Já outro trabalho demonstrou que o período de incubação entre ambas as formas atípicas é mais prolongado quando comparado a forma clássica da EEB em bovinos, o que justifica a ocorrência dessas formas em animais mais velhos (acima de oito anos) (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b).

Posteriormente, outro experimento, conduzidos por Iwamaru e colaboradores (2010), avaliou o acúmulo de príons da EEB tipo L no tecido nervoso periférico de bovinos. Houve inoculação do agente, por via intracerebral, em cinco bovinos de 2-3 meses de idade, da raça Holstein. Após um período de incubação de 10 a 12 meses, foi realizada a eutanásia desses animais e verificou-se que o agente se propaga, inicialmente, no Sistema Nervoso Central e, da mesma forma que o observado na forma clássica (HOFFMANN et al., 2007), na fase terminal da doença, há uma difusão centrífuga pelas terminações nervosas a outros tecidos nervosos (TABELA 8). Não se observou, nesse experimento, deposição do agente nos

tecidos linfoides, corroborando com estudos anteriores (LOMBARDI et al., 2008). Essa difusão centrífuga periférica não foi observada nos primeiros trabalhos sobre a distribuição do príon da EEB tipo L na Itália (LOMBARDI et al., 2008).

| Bovinos infectados pela EEB tipo L | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tecidos nervosos | Bov 1 | Bov 2 | Bov 3 | Bov 4 | Bov 5 |
| Óbex | + | + | + | + | + |
| Medula Espinhal | + | + | + | + | + |
| Cauda Equina | + | + | + | + | + |
| Nervo Óptico | + | + | + | + | + |
| Glândula Pituitária | + | + | + | + | + |
| Gânglio Trigêmio | + | + | + | + | + |
| Nervo Vago | + | + | + | + | + |
| Plexo Braquial | - | - | + | + | + |
| Nervo Ciático | - | + | + | + | + |
| Glândula Adrenal | - | + | + | + | + |

TABELA 8 - DETECÇÃO, PELA TÉCNICA DE WB, DE PRP^{SC} EM AMOSTRAS DE TECIDOS OBTIDOS DE BOVINOS DESAFIADOS COM O AGENTE DA EEB TIPO L

FONTE: Adaptado de Iwamaru e colaboradores (2010)

Achados dessa importância enfatizam a necessidade do conhecimento sobre a distribuição do agente da EEB tipo L nos tecidos dos bovinos, para que haja a correta definição dos materiais de risco específico a serem removidos e destruídos, garantindo a proteção dos consumidores (IWAMARU et al., 2010).

Depois da descoberta da variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob, como uma nova doença priônica emergente na década de 90, hoje as autoridades em saúde pública humana demonstram preocupação em relação a EEB tipo L, pela característica mais virulenta quando comparada a EEB clássica (SEUBERLICH et al., 2010).

Afirmar que a EEB tipo L tem potencial zoonótico superior à EEB clássica ainda é prematuro, pois há necessidade de investigações mais intensas especialmente quanto ao tropismo tecidual desse agente, pois a habilidade de colonizar tecidos linfoides é fator chave para o sucesso da transmissão oral do príon (BÉRINGUE et al., 2008).

EEB tipo H

O agente da EEB tipo H foi transmitido experimentalmente em camundongos normais (BARON et al., 2006; CAPOBIANCO et al., 2007) e em camundongos transgênicos PrP bovino e ovino (BÉRINGUE et al., 2006; BÉRINGUE et al., 2007). Nesses experimentos, não houve conversão do agente e alteração fenotípica para o tipo clássico, como se observou na EEB tipo L. Porém, estudos posteriores demonstraram que o agente da EEB tipo H foi capaz de se converter no tipo clássico, após sucessivas passagens em camundongos comuns (BARON et al., 2011) e em camundongos transgênicos para PrP^C bovino (TgBov) (TORRES et al., 2011). Estes resultados demonstram a capacidade do príon da EEB tipo H em adquirir características da forma clássica, quando da presença de proteína PrP^C bovina. Isso reforça a hipótese de que o agente que originou a epidemia de EEB clássica pode ter se originado a partir dessa forma atípica (TORRES et al., 2011).

Béringue e colaboradores (2006) demonstraram que a taxa de ataque em camundongos transgênicos para PrP bovino (TgBov) e ovino (TgOv), inoculados com isolados da EEB tipo H, era de 100%. Além disso, o tempo de sobrevivência desses indivíduos mostrou-se significativamente superior ao observado na EEB clássica (BÉRINGUE et al., 2006). Em ambos os camundongos inoculados com o agente da EEB tipo H, observou-se vacuolização muito mais intensa no encéfalo, quando comparado com a forma clássica. A localização das lesões também foi diferenciada, sendo mais observada no septo, hipotálamo, hipocampo e córtex, com severa espongiose. Ao contrário do observado na infecção pelo agente da EEB clássica, não se observou depósitos de PrP^{SC} da EEB tipo H no baço dos camundongos TgOv (BÉRINGUE et al., 2006).

Em inoculações intracerebrais em camundongos transgênicos tg650 PrP humano, o isolado de EEB tipo H não infectou, nem transmitiu a doença a esses animais. Esse resultado reforça a hipótese de que há uma forte barreira de transmissão desse tipo de EEB entre os bovinos e seres humanos (BÉRINGUE et al., 2008).

Okada e colaboradores (2011) demonstraram que a distribuição do agente da EEB tipo H também foi diferenciada, em experimentos de inoculação intracerebral em bovinos. Em relação aos casos clássicos da EEB, onde se observa maior deposição na região do tronco encefálico que no córtex (WELLS et al., 1991; SIMMONS et al., 1996), na EEB tipo H teve distribuição mais cortical (córtex frontal, tálamo e hipotálamo). Além disso, o escore de lesão vacuolar dos bovinos desafiados com a EEB tipo H foi superior ao observado nos casos de EEB clássica (OKADA et al., 2011).

Dos mais de 30 casos de EEB tipo H diagnosticado no mundo até o momento, apenas dois dispunham de todo o encéfalo para a análise. Ambos os casos foram diagnosticados na Suíça, sendo o primeiro relatado em um zebuino (*Bos indicus*) de 19 anos (SEUBERLICH et al., 2006) que apresentou sinais clínicos neurológicos e lesões espongiiformes em todo o encéfalo.

O segundo caso, relatado por Guldimann e colaboradores (2012), ocorreu em um bovino de seis anos e meio, encaminhado ao abate de emergência e que, conseqüentemente, foi testado para a EEB pelo sistema de vigilância da doença. Não se observou, ao exame histopatológico, lesões espongiiformes. Como todo o encéfalo estava disponível para análises, foram utilizados testes rápidos para determinar a distribuição neuroanatômica do agente da EEB tipo H. Assim, verificou-se que a distribuição do agente estava restrita primeiramente ao óbex (onde se observou a maior quantidade do agente), seguido do tálamo, hipocampo, núcleo basal, córtex cerebelar e lobo piriforme. Segundo os autores, considerando baixa faixa etária do animal e a distribuição restrita do agente, há a possibilidade de que animal estivesse no estágio pré-clínico da EEB tipo H.

Esse caso evidencia que a etiologia da EEB tipo H pode não estar relacionada com a ingestão de FCO contaminada com o príon, visto que esse animal nasceu após a proibição da utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes (*feed ban*) na Suíça (GULDIMANN et al., 2012).

2.4 Sinais Clínicos

As EEB atípicas, ao contrário da forma clássica, não estão sendo diagnosticadas em animais com sinais clínicos neurológicos, mas sim em bovinos aparentemente saudáveis encaminhados ao abate de rotina, ao abate de emergência ou em bovinos em decúbito, sugerindo que sua apresentação clínica é diferente da EEB clássica (KONOLD et al., 2012).

Como a descoberta das formas atípicas da EEB é recente (pouco mais de dez anos), aliada ao fato da pouca disponibilidade de material para pesquisa, ainda há poucos trabalhos disponíveis sobre a transmissão dessas enfermidades para bovinos. Somente seis trabalhos sobre transmissão de EEB atípicas a bovinos estão publicados atualmente (LOMBARDI et al., 2008; FUKUDA et al., 2009; OKADA et al., 2011; BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a, BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b e KONOLD et al., 2012).

Na opinião de Konold e colaboradores (2012), a síndrome nervosa observada em bovinos inoculados com as formas atípicas de EEB é estatisticamente semelhante à síndrome nervosa que ocorre nos casos clínicos da EEB clássica. A única diferença notável em relação à forma clássica é a ausência de tremores, a dificuldade de levantar e a dismetria já nas fases iniciais da doença, em todas as formas atípicas.

A análise de alterações comportamentais e sensoriais em bovinos infectados experimentalmente por via intracranial acaba sendo influenciada pelo aumento da frequência de testes neurológicos e pelo excesso de estimulação desses animais, como consequência da pesquisa (KONOLD et al., 2012). Assim, a interpretação dos sinais clínicos apresentados por animais em situações experimentais é delicada, pois pode não haver correspondência com o que de fato ocorre nos casos a campo (onde há menos estímulos e contato com seres humanos).

Em relação aos sinais clínicos, postulou-se que as diferentes formas da EEB em bovinos parecem produzir dois fenótipos clínicos principais: a forma nervosa ou a forma “apática”, sendo a EEB clássica a que apresenta os sinais clínicos mais intensos e uniformes (especialmente em relação ao nervosismo) (KONOLD et al., 2012). O desenvolvimento da forma apática só foi observado em bovinos com curso clínico prolongado, e que previamente

apresentaram a forma nervosa da doença. Isso pode sugerir que todos os bovinos acometidos com as formas atípicas da EEB podem eventualmente desenvolver a forma apática, caso não sejam sacrificados ou abatidos antes (KONOLD et al., 2012).

Até o presente momento, todos os bovinos inoculados com as EEB atípicas não apresentaram decúbito permanente, porém todos apresentaram dificuldades para levantar (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b; KONOLD et al., 2012). Essa característica clínica explica a razão pela qual a maior parte dos casos de EEB atípicas diagnosticados a campo estarem relacionados a animais caídos (RICHT et al., 2007; STACK et al., 2009; GAVIER-WIDEN et al., 2008).

Sinais clínicos em bovinos

Os primeiros estudos das EEB atípicas transmitidas a bovinos foram realizados por Lombardi e colaboradores (2008). Nesse trabalho, os sinais clínicos apresentados pelos bovinos inoculados com o agente da EEB tipo L foram claramente diferentes do observado na EEB clássica, e incluíam depressão, cabeça baixa e decréscimo no estado de alerta, sendo o oposto do que se observou nos animais controle (hipersensibilidade, agressividade, reflexo exagerado). Esse mesmo estudo demonstrou que a EEB tipo L causou atrofia muscular, atribuída a redução da atividade motora neural.

Por outro lado, estudos posteriores demonstraram que a apresentação clínica de bovinos desafiados com as EEB atípicas (tipo L e H), por via intracerebral, pareceram semelhantes (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011b; KONOLD et al., 2012). Os sinais de depressão e cabeça baixa, demonstrados na pesquisa de Lombardi (2008) não foram consistentes nesses últimos estudos.

Balkema-Buschmann e colaboradores (2011b) realizaram um experimento de inoculação intracerebral das EEB atípicas (tipo H e L) e demonstraram que os primeiros sinais clínicos apareceram aos 14 meses após a inoculação, independente do inóculo recebido. Ainda nesse trabalho, observou-se que primeiramente houve uma queda de peso, seguido alterações comportamentais (separação dos demais animais do rebanho) e

cabeça baixa. Os sinais evoluíram para hipersensibilidade a estímulos acústicos, visuais e táteis, não sendo possível a distinção desses sinais em relação ao fenótipo da EEB clássica. A fase terminal deu-se com o início da ataxia e queda de membros posteriores.

No estudo de Konold e colaboradores (2012), os primeiros sinais notados, como inquietação e cabeça baixa, apareceram entre oito e 11 meses após a inoculação e evoluíram para sinais motores, como relutância em atravessar obstáculos (corredores), corroborando com os achados de Okada e colaboradores (2011). Após a apresentação da forma nervosa da doença nos bovinos inoculados com a EEB tipo H, eles desenvolveram tardiamente (aos 21 meses após a inoculação) comportamentos mais lentos, havendo o desaparecimento dos reflexos exacerbados a estímulos e os animais aparentavam estar menos atentos ao ambiente. Chutes forçados em resposta a toques nos membros posteriores só foram observados nos animais inoculados com a EEB tipo L.

No bovino inoculado com a EEB tipo H observou-se um ataque de pânico (andar em círculos seguido de queda com permanência em decúbito lateral por aproximadamente 5 minutos), aos 19 meses após a inoculação (KONOLD et al., 2012). Essa reação não foi observada por Okada e colaboradores (2011); ao contrário, nesse estudo, os bovinos inoculados com a EEB tipo H apresentaram outros sinais como queda de peso 3 a 4 meses após o aparecimento dos sinais, e posteriormente, já na fase terminal, apresentaram ataxia e queda dos membros posteriores, sendo que nenhum dos animais apresentou alterações comportamentais como nervosismo ou agressividade.

A duração dos sinais clínicos das formas atípicas de EEB no estudo de Konold e colaboradores (2012) foi de 4 a 10 meses para a EEB tipo L, e 2 a 7 meses para a EEB tipo H, sendo mais longa quando comparado aos estudos de Lombardi (2008), Fukuda (2009) e menor quando comparado ao estudo de Okada e colaboradores (2011). Essas variações na duração clínica da doença podem ser atribuídas as raças dos bovinos utilizadas nesses estudos (KONOLD et al., 2012), da mesma forma que ocorreu com estudos da forma clássica da EEB (WILESMITH et al., 1992b).

Observa-se que ainda não é possível definir claramente quais os sinais clínicos característicos das formas atípicas, bem como seu período de incubação e tempo de manifestação clínica, pois poucos estudos chegam a mesma conclusão. Como já dito anteriormente, são necessários mais estudos na tentativa de elucidar como essas doenças ocorrem na população.

Sinais clínicos em primatas

Em experimentos de transmissão das EEB atípicas, por via intracerebral, à primatas da espécie *Macaca fascicularis*, Comoy e colaboradores (2008) observaram o desenvolvimento dos primeiros sinais 21 meses após o desafio (significativamente mais rápido do que o observado nos animais inoculados com a forma clássica da EEB). Os principais sinais clínicos se desenvolveram lentamente nos primeiros quatro meses, limitando-se a pequenos tremores e mioclonia, sem sinais de incoordenação, problemas locomotores ou alterações comportamentais como ansiedade ou agressividade (COMOY et al., 2008).

O quadro clínico piorou rapidamente no último mês de vida do primata, quando se observou uma intensa desorientação (o animal não reconhecia o ambiente e parecia perdido), problemas cognitivos, incoordenação acentuada e desequilíbrio. A eutanásia foi realizada na fase terminal da doença, por questões de bem-estar animal, no 26º mês.

Em um estudo posterior, realizado por Ono e colaboradores (2011), utilizando essa mesma espécie, os achados clínicos foram similares: início dos sinais aos 19 e 20 meses após o desafio, tremores, mioclonia, com curso agudo culminando na eutanásia na fase terminal da doença, ao 24-25º mês.

2.5 Diagnóstico

Até 2004, pensava-se que a conformação no WB era única para todos os PrP^{RES} tanto na EEB natural quanto na experimental (STACK et al., 2004). Estudos posteriores demonstraram a existência de outras conformações no WB, relacionadas a formas atípicas de EEB, o que criou um desafio no campo diagnóstico.

Para Seuberlich e colaboradores (2010), o diagnóstico clínico das formas atípicas de EEB é bastante limitado pois ainda estão sendo definidos quais sinais são característicos dessas enfermidades. Um estudo de Balkema-Buschmann e colaboradores (2011b) concluiu ser impossível o diagnóstico das formas atípicas apenas com os achados clínicos.

Com base nos estudos de sinais clínicos já realizados, pode-se considerar as EEB atípicas em diagnósticos clínicos diferenciais em bovinos idosos (com mais de oito anos) encontrados caídos, com dificuldade de se levantar, e com histórico ou presença de reações exacerbadas a estímulos externos (KONOLD et al., 2012).

Estudos de patogenia e distribuição do agente das EEB atípicas demonstraram que os depósitos do PrP^{Sc} estão distribuídos nas porções mais craniais do encéfalo e também no cerebelo. Em todos os estudos realizados, houve detecção do agente na altura do óbex, porém em menor quantidade quando comparado com outras regiões cerebrais. Nesse sentido, Konold e colaboradores (2012) propõem que se seja considerada a possibilidade de se ampliar os materiais de eleição para diagnóstico nas ações de vigilância ativa de EEB, incluindo o cerebelo (que pode ser retirado, da mesma forma que o tronco encefálico, pelo forame magno, sem a necessidade da abertura da cabeça).

Quanto aos testes laboratoriais, Meloni e colaboradores (2012) definem ser imprescindível o uso de testes rápidos capazes de detectar todos os tipos de EEB, visando para proteger o consumidor de uma exposição acidental ao agente.

Até 1999, o sistema de vigilância da EEB na UE era eminentemente passivo (baseava-se no atendimento, pelo serviço veterinário oficial, de animais com sinais clínicos). As amostras de SNC coletadas eram submetidas aos exames de histopatologia, buscando lesões sugestivas, e imunohistoquímica, para a identificação do PrP^{Sc}. Os ensaios de diagnóstico molecular rápidos tornaram-se oficiais e disponíveis apenas no final dos anos 90 (EC, 1998). Com o reforço na regulamentação da vigilância na UE, o uso dos testes rápidos se tornou obrigatório (EFSA, 2001) e, conseqüentemente, um grande número de países detectaram seus primeiros casos de EEB (MELONI et al., 2012).

Os primeiros testes rápidos, utilizados na vigilância ativa na Europa, foram avaliados cientificamente buscando determinar sua sensibilidade analítica e acurácia, utilizando amostras de animais com sinais clínicos (MOYNAGH & SCHIMMEL, 1996). Na sequência, a UE avaliou a utilização destes testes em situações de rotina, incluindo em amostras autolisadas (WOLFGANG & PAVEL, 2004).

O fato da transmissão experimental do príon das EEB atípicas se mostrar mais insidiosa que a EEB clássica (BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a), a avaliação da performance dos testes rápidos já aprovados para a detecção de casos atípicos se tornou prioridade (MELONI et al., 2012).

Dessa forma, a UE avaliou 19 testes-rápidos para diagnóstico da EEB, sendo apenas nove aprovados para uso na vigilância oficial (EFSA, 2010). Vários estudos foram conduzidos para estabelecer parâmetros de sensibilidade dos testes-rápidos, sendo o limite mínimo de detecção padronizado em $2\log_{10}$ para a EEB clássica (EFSA, 2009; EFSA, 2010; EFSA, 2007).

Buscando avaliar a eficácia dos testes-rápidos nas EEB atípicas, Meloni e colaboradores (2012) analisaram o desempenho dos testes aprovados pela UE disponíveis no mercado perante amostras de EEB tipo H, tipo L e clássica. Como resultado, observou-se que a princípio, todos os testes rápidos aprovados são capazes de detectar formas atípicas de EEB, com diferentes sensibilidades. Apesar dessas diferenças, o limite de detecção dos testes utilizados frente às diferentes formas de EEB ficou acima de $2\log_{10}$, limite aprovado pela UE, sendo considerados efetivos na detecção de qualquer forma de EEB.

Com o tempo, novos testes bioquímicos discriminatórios de EEB e scrapie foram desenvolvidos baseando-se, então, nas diferentes sensibilidades a proteinase K, diferentes sítios de clivagem (GRETZSCHEL et al., 2005; LEZMI et al., 2004; NONNO et al., 2003; STACK et al., 2002; THURING et al., 2004).

O diagnóstico diferencial das atípicas baseia-se nas características moleculares do PrP^{RES} identificadas através da técnica de WB (MELONI et al., 2012). Após a digestão pela proteinase K, o PrP^{RES} pode apresentar três glicofomas: a não-glicosilada, a monoglicosilada e a diglicosilada.

Dependendo da quantidade de cada uma dessas glicofomas e sua posição na banda do WB, faz-se a separação dos agentes da EEB nos tipos clássico, H (*higher*) e L (*lower*) (JACOBS, et al., 2007).

A EEB tipo H e L apresentam massa molecular maior e menor, respectivamente, nas porções não glicosiladas do PrP^{RES} pela técnica de Western blot em relação à forma clássica (FIGURA 4). Além disso, a EEB tipo L tem uma menor proporção de PrP^{RES} diglicosilado, sendo a característica molecular mais marcante desse agente (CASALONE et al., 2004).

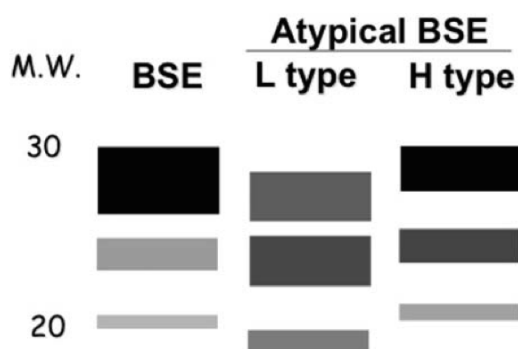


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DAS BANDAS PARA DIFERENCIAÇÃO DAS EEB CLÁSSICA E ATÍPICAS, PELO EXAME DE WB

FONTE: Brown e colaboradores (2006)

2.6 Desafios para o controle

Desde 2004, Biacabe e colaboradores reforçam a possibilidade da EEB ter diferentes manifestações, o que poderia impactar nas medidas de controle da doença em vigor já naquela época. Além disso, reiteraram a necessidade da realização de novos estudos para determinar a frequência desses príons atípicos na população bovina e outros achados biológicos envolvendo essa cepa infectante.

Considerando uma possível origem espontânea e esporádica das formas atípicas, é factível que elas persistam nos rebanhos bovinos mesmo após a erradicação da forma clássica da EEB. Considerando que tanto o agente da EEB tipo L (BÉRINGUE et al., 2006), quanto o tipo H (GULDIMANN et al., 2012) se converteram na forma clássica após passagens em camundongos, há um risco constante da reemergência da EEB clássica caso a proibição do uso de subprodutos de origem animal na

alimentação de ruminantes (*feed ban*) seja diminuída ou revogada. Por consequência, algumas medidas de mitigação de risco deverão ser continuamente e permanentemente mantidas, até que se tenha maior conhecimento sobre o potencial das EEB atípicas (GULDIMANN et al., 2012).

Mesmo que as normas que regem a classificação de risco dos países perante a EEB não diferenciem suas formas atípicas (OIE, 2014), as análises de risco e a implantação de programas de controle e vigilância da EEB devem levá-las em consideração (GULDIMANN et al., 2012).

Meloni e colaboradores (2012) e outros pesquisadores afirmam que o uso de FCO, originária de um animal portador de uma das formas atípicas de EEB, na alimentação dos bovinos pode ter sido a origem da epidemia, pois, sob certas circunstâncias, os príons causadores das formas atípicas podem alterar suas propriedades bioquímicas e causar a doença clássica.

Dessa forma, o conhecimento sobre a patogenia das formas atípicas da EEB é fundamental para a determinação das medidas de controle da doença, em especial o potencial risco da exposição humana ao agente. Atualmente, assume-se que a distribuição do agente das atípicas é semelhante ao observado nos casos clássicos. Porém, se for comprovado que essa distribuição é diferenciada, principalmente no que se refere aos materiais de risco específico, poderemos ter problemas de saúde pública e na mitigação de risco (SEUBERLICH et al., 2010).

É interessante ressaltar que o número de casos de EEB atípicas é infinitamente inferior aos casos clássicos durante a epidemia nos anos 90. Por essa razão a demonstração do possível caráter zoonótico das EEB atípicas pode não acarretar na pronta mudança nas ações de mitigação de risco dessa doença, pois o risco de exposição a esses agentes é baixo (SEUBERLICH et al., 2010).

Vigilância da EEB e implicações das formas atípicas

A eficiência de um programa de vigilância para determinada doença depende de muitos fatores. Para que se tenha uma eficiente vigilância passiva, é necessário que haja o reconhecimento dos sinais clínicos e alta

sensibilidade por parte dos proprietários e médicos veterinários para a notificação da doença (SEUBERLICH et al., 2010).

Já na vigilância ativa, o ponto chave é a determinação das subpopulações-alvo, o tipo de amostra a ser analisada e a performance dos testes de triagem aplicados. Por fim, para ambos os tipos de vigilância, há necessidade de uma eficiente e ampla rede laboratorial, capaz de identificar e rejeitar animais portadores das EET, e também ser capaz de diferenciar as formas atípicas das clássicas (SEUBERLICH et al., 2010).

No primeiro caso diagnosticado com EEB tipo L, observou-se menores quantidades de PrP^{Sc} no tronco encefálico e óbex, ao contrário da região olfatória e tálamo (CASALONE et al., 2004). Esses achados podem questionar a confiabilidade na detecção de casos de EEB atípicas, visto que o material alvo para o diagnóstico é a região do tronco encefálico e óbex (CASALONE et al., 2004; BALKEMA-BUSCHMANN et al., 2011a).

Caso se comprove que as EEB atípicas podem se converter em casos clássicos a campo, sua erradicação fica seriamente comprometida, e a redução da vigilância ativa pode comprometer o diagnóstico de casos no futuro (SEUBERLICH et al., 2010).

a) Vigilância Passiva: apenas poucos casos atípicos foram identificados durante a vigilância passiva, pois a grande maioria não apresentava sintomatologia nervosa (OIE, 2014). Assim, a vigilância passiva não se mostrou eficiente para a detecção destes casos. Diferentes fatores colaboram para essa situação como: desconhecimento sobre a patogenia e sinais clínicos das formas atípicas; em muitos casos não há relato de sinais clínicos nervosos e ainda não se sabe em qual ponto a doença se manifesta clinicamente. Tudo isso colabora para que a vigilância passiva não seja capaz de detectar esses animais. Segundo, a prevalência das EEB atípicas é extremamente baixa, conforme descrito no item 2.3 (SEUBERLICH et al., 2010).

b) Vigilância Ativa: a vigilância ativa busca detectar casos positivos que escaparam da vigilância passiva. Dessa forma, a vigilância ativa é mais onerosa e requer uma logística que permita o serviço veterinário oficial rastrear a amostra do laboratório até a propriedade de origem do animal (SEUBERLICH et al., 2010). Segundo Doherr e colaboradores (2001), a

detecção de casos de EEB clássica em bovinos foi mais eficiente nas categorias de vigilância de abate de emergência e animais caídos, do que na categoria de vigilância de abate de rotina. Essa situação ainda não é clara nas EEB atípicas, pois apesar de muitos desses casos terem sido detectados em indivíduos pertencentes as categorias “bovinos caídos” e oriundos do abate de emergência, ainda não se tem uma análise estatística da prevalência da doença nos diferentes tipos de vigilância (SEUBERLICH et al., 2010).

A vigilância ativa foca nos bovinos adultos, pois a doença normalmente não se manifesta em bovinos jovens. Baseando-se na situação epidemiológica, análise de risco e de custo-benefício, alguns países da UE aumentaram a idade mínima de idade para 48 meses na vigilância ativa (EFSA, 2008). Considerando as formas atípicas da EEB, essa alteração na idade mínima de vigilância não compromete a sensibilidade do sistema na detecção tanto de casos clássicos como atípicos. Ao contrário, espera-se que com o aumento da vigilância em animais mais velhos tenha-se um incremento na detecção de casos atípicos (SEUBERLICH et al., 2010).

c) amostragem: tanto para a EEB clássica, quanto para as atípicas, o material de eleição para análise laboratorial é a região do óbex, que pode ser facilmente obtida pela utilização de uma colher especial via introduzida no forame magno, sem a necessidade da abertura do crânio. Estudos demonstram que nas EEB atípicas, a deposição do príon PrP^{Sc} no SNC dá-se nas porções mais corticais e frontais (CASALONE et al., 2004; BIACABE et al., 2004), diferente do que se observa nos casos clássicos, porém é necessária a realização de maiores estudos nesse sentido (SEUBERLICH et al., 2010).

d) testes diagnósticos: os testes de triagem para EEB foram inicialmente implantados na Suíça e, posteriormente, pela UE após sua validação. A falta de materiais de referência para as EEB atípicas limita a análise de novos protocolos de diagnósticos e testes de eficiência de ensaios laboratoriais (SEUBERLICH et al., 2010).

Juntando-se a isso, há muita incerteza envolvendo as formas atípicas, sendo muito difícil avaliar a eficiência do seu programa de vigilância. Estudos de transmissão experimentais ajudarão a elucidar as características

fenotípicas das EEB atípicas, além de ampliar a oferta de materiais de referência para o desenvolvimento e validação de métodos de diagnóstico. Os achados desses estudos podem subsidiar análises de risco e de custo benefícios para embasar potenciais mudanças no programa de vigilância (SEUBERLICH et al., 2010).

Embora já se tenha confirmado a ligação entre a EEB clássica e a variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob em seres humanos (WILL et al., 1996), não foi identificada nenhuma associação entre as EEB atípicas e as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis humanas: não há ligação epidemiológica que indique que se tratam de zoonoses. Porém, as características moleculares da EEB tipo L são semelhantes à doença esporádica de Creutzfeldt-Jakob, além disso, os estudos utilizando camundongos transgênicos de PrP humano e primatas demonstraram que o agente da EEB tipo L se replica com mais eficiência que o da EEB clássica (BÉRINGUE et al., 2008; COMOY et al., 2008; KONG et al., 2008).

Brown e colaboradores, (2006) ponderam que existe a possibilidade de ao menos alguns casos de DCJ esporádica possam ser relacionados a infecção humana pelo consumo de animais infectados EEB atípicas, porém não há ligações epidemiológicas visto que não há comprovação, em nenhum dos casos, de exposição a animais infectados. Atribui a dificuldade de se estabelecer ligações entre a EEB atípica e a Doença de Creutzfeldt-Jakob ao pouco conhecimento sobre os parâmetros de infecção das formas atípicas da EEB, como por exemplo, hospedeiro, infectividade em tecidos, rota de transmissão e dose mínima infectante para seres humanos.

Considerando que há uma pressão para a retirada da proibição de alimentar ruminantes com FCO, esses aspectos devem ser fortemente considerados para evitar o risco de uma reemergência da EEB nos rebanhos (SEUBERLICH et al., 2010).

3 DESCRIÇÃO DO CASO BRASILEIRO

Title: Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy in Latin America: first case reported in Brazil

Authors: Ellen Elizabeth Laurindo^{1,3} Elaine Fátima de Sena² Carlos Henrique Pizarro Borges² Ivan Roque de Barros Filho³

Affiliations: 1 Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, Curitiba, Paraná, Brazil

2 Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, Brasília, Distrito Federal, Brazil

3 Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

Abstract

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) had never been reported in Latin America until 2012 when the Brazilian authorities identified the first case, confirmed by the OIE reference laboratory in UK. Here, we describe this first case of atypical BSE recorded in the region, including the epidemiological investigation and the laboratorial findings.

=====

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is a progressive disease affecting the central nervous system (CNS), first identified in 1986 in United Kingdom (1). BSE is classified among the group of prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSE), affecting a wide range of mammalian hosts and include Creutzfeldt-Jacob disease in humans and scrapie in sheep and goats (2). These diseases are characterized by the accumulation in the brain of an abnormal isoform cellular prion protein (PrP^C), normally found in host tissues and show neurological disorders. Clinically, the disease is characterized by alterations in behavior, ataxia and wasting. Meat and bone meal (MBM) contaminated with the agent compound feed ingredients promulgated the epizootic (3).

Studies shown two distinct forms deviate phenotypically from the previously identified classic BSE (C-type), the H-type (4) and L-type (5), occurring in animals that were between eight and 15 years of age. Since the introduction of active surveillance for BSE, there have been reports of this atypical BSE in cattle from several countries in Europe, Asia and North America (6). The finding of different forms of BSE in all this countries and continents show that their occurrence is not restricted to certain geographical regions, and different cattle such as *Bos taurus* and *Bos indicus* (7). It has been speculated that atypical BSE may be genetically or sporadic caused. While the significance of these forms of diseases remains to be more precisely established, there is a question about their possible occurrence, in other parts of the world, including in regions that never report BSE (and other TSEs) before (8).

Brazil has the largest commercial cattle herd in the world, with approximately 212 million heads and this continental dimension (8,515,767 km²) allows extensive cattle grazing, with extensive breeding accounting for about 93% of the herd (9).

The Study

On December 2010, the Official Veterinary Services (OVS) were informed by the owner of a holding in the municipality of Sertanópolis (State of Paraná), on a recumbent bovine was detected during routine inspection. Next day, when the OVS were going to visit the holding, they were informed by the stockman that the animal was dead. The OVS went to the holding to collect information and samples for the diagnosis of the cause of the death. As it is an area where rabies is present in herbivores, samples were taken for the diagnosis of this disease and for differential diagnosis, as recommended by the national protocol. The animal was properly buried on site. The sample was tested negative for rabies, and was sent to proceed the TSE immunohistochemistry (IHC) test in the National Reference Laboratory National Agricultural Laboratory (LANAGRO-PE), Recife, Pernambuco.

On June 2012, this sample result positive by IHC test (figure 1). According to the procedure manual on response to the occurrence of a BSE event in Brazil and as it is the first occurrence in the country, the sample was sent for confirmatory diagnosis to the OIE Reference Laboratory for this disease, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), Weybridge, United Kingdom. The sample tested positive again in immunohistochemical test on 6 December 2012 and the notification to OIE was on 7 Dec 2012. At the same time, the AHVLA proceed tests for biochemical BSE strain characterization.

The AHVLA concluded the Western immune blotting tests came out inconclusive for typing of BSE. However, the AHVLA laboratory report highlighted that the prion in question had some characteristics of the H type rather than L or C-Type of BSE.

In compliance with chapter 11.4 of the OIE Terrestrial Code (10), the Brazilian OVS promoted research to identify cohorts and their proper disposal. All cohort animals were identified and were cows around 15 years old and in good health conditions, which were humanely euthanized and their carcasses were buried in a deep pit in appropriate premises. Samples from these animals were tested for BSE at LANAGRO Recife/PE Laboratory and all resulted negative.

Considering the results of the epidemiological investigation conducted by the Brazilian OVS and this laboratory result, Brazilian authorities concluded that the occurrence was an atypical BSE (rare and spontaneous).

Conclusions

The case showed characteristics unusual for BSE, such as advanced age (around 13 years) associated with the acute course until death (less than 24 hours). Hence, epidemiological and laboratory evidence points towards an atypical case of BSE, which can occur sporadically and spontaneously in any country in the world and is not related to the ingestion of contaminated food.

It is feasible that for a country demonstrated your sanitary condition, it must have a robust system of monitoring and complying with the obligation to notify sanitary events occurring in its territory, For this reason, despite the occurrence of this case, OIE still recognizes Brazil as a negligible risk country for BSE. The diagnostic methods for BSE Surveillance in Brazil showed able to identify an H-type BSE case but, to improve the quality of the CNS samples, that allows a conclusive molecular diagnosis the Brazilian BSE Surveillance System is updating techniques for collection and storage of samples.

The fact this case have been found in a country that did not experience classical BSE so far, like Sweden (11), could reinforce the hypothesis of spontaneous origin of atypical BSE.

In conclusion, this Brazilian case, the first notified in Latin America, could help the scientific community with important information for future epidemiological studies.

Acknowledgments

We thank Elzira Jorge Pierre, Orasil Bandini and Rosilei Favarão Andreolli for excellent investigation support, and Cláudio S.L. Barros for laboratory support.

Author Bio

Ellen Elizabeth Laurindo is a veterinarian and works in BSE surveillance program at Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

References

1. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Records*. 1987; 121:419-420.
2. Hörnlimann B, Keulen L, Ulvund M, Bradley R. Portrait of scrapie in sheep and goats. *Prions in human and animals*. 2006; Walter de Gruyter GmbH & CO KG, Berlin.
3. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Veterinary Records*. 1991; 128:199-203.
4. Biacabe A G, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*. 2004; 5:110-115.
5. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:3065-3070.
6. Brown P, MsShane LM, Zanusso G, Detwiler L. On the Question of Sporadic or Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12:1816-1821.
7. Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45:1821-1829.
8. Baron T, Biacabe AG, Arzac JN, Benestad S, Groschup MH. Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. *Vaccine*. 2007; 25:5625-5630.
9. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria accessed in 05/25/2014.
10. OIE. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 11.4. – Bovine spongiform encephalopathy. 2014. <http://www.oie.int> accessed in 07/22/14.
11. Gavier-Widén D, Nöremark M, Langerveld JPM, Stack M, Biacabe AG, Vulin J, et al. Bovine Spongiform Encephalopathy in Sweden: an H-Type Variant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008; 20:2-10.

Address for correspondence: Ellen Elizabeth Laurindo, Serviço de Saúde Animal (SSA-PR), Superintendência Federal de Agricultura no Paraná, Rua José Veríssimo, 420, 82820-000 Curitiba, Paraná, Brasil ; email: ellen.laurindo@agricultura.gov.br

Capítulo 2: Descrição do Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB no Brasil e nos Estados Unidos

Nesse capítulo será descrito, primeiramente, o sistema de vigilância e prevenção da EEB proposto pela OIE, que normalmente baliza todos os sistemas de vigilância dos países signatários desta Organização.

Em seguida serão descritos os sistemas de vigilância do Brasil e dos Estados Unidos, as estruturas de seus serviços veterinários, amparos legais para o desenvolvimento do sistema de vigilância, abordando principalmente as características peculiares de cada programa.

4 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB segundo a OIE

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sediada em Paris, é a entidade intergovernamental responsável por promover a saúde animal em todo o mundo, abrangendo atualmente 178 países e territórios. Para isso, essa organização dispõe de Comitês compostos por consultores técnicos reconhecidos em suas respectivas áreas de especialidade, que elaboram publicações técnicas visando balizar as tomadas de ações de controle, prevenção e erradicação de doença nos animais.

O Código Sanitário dos Animais Terrestres é uma das publicações mais importantes dessa organização, pois nele tratam-se das garantias de segurança sanitária no comércio internacional dos animais terrestres e de seus produtos (OIE, 2014). Ele objetiva auxiliar as Autoridades Sanitárias responsáveis por elaborar as normas relativas ao comércio (importação e exportação) e a defesa sanitária animal como um todo (programas de vigilância, controle e erradicações de determinadas enfermidades).

As medidas propostas pela 23ª edição do Código foram formalmente aceitas pelos países-membros durante a 82ª Assembleia Mundial de Delegados, ocorrida em maio de 2014. É publicado nas três línguas oficiais da OIE: inglês, espanhol e francês. Em seu primeiro volume são abordadas as considerações gerais relacionadas ao controle sanitário dos animais de um país, zona ou compartimento, como princípios de análise de risco, rastreabilidade e qualidade dos serviços veterinários. O segundo volume

aborda doenças específicas que afetam os animais e que estão associadas com restrições ao comércio internacional, dentre elas está a EEB.

O capítulo 11.4 do Código Terrestre trata das normas de comércio internacional de bovinos e seus subprodutos considerados de risco para a introdução do agente da EEB, bem como da classificação dos países em relação à doença (risco negligenciável, controlado ou indeterminado). Com relação à vigilância, o artigo 11.4.20 faz o delineamento dos programas baseando-se na classificação de risco do país, da presença do agente no seu território, capacidade ou limitações diagnósticas, entre outras diretrizes que serão descritas nos próximos itens (OIE, 2014).

4.1 Vigilância epidemiológica para EEB

O Código Terrestre relata que o programa de vigilância pode ser empregado com os objetivos de determinar a presença ou ausência de um agente no país, e em caso afirmativo, monitorar sua evolução. Dessa forma, a base da vigilância para a EEB proposta pelo Código é a análise das categorias com maior probabilidade de apresentar a doença, as chamadas populações de risco (OIE, 2014). Da mesma forma, é dada ênfase ao monitoramento da eficácia das medidas de mitigação de risco adotadas.

A OIE sugere que os programas de vigilância sejam formulados levando-se em conta as limitações diagnósticas associadas às populações de risco e a distribuição relativa da população infectada dentro destas (OIE, 2014).

Para fins de vigilância, a população bovina suscetível à EEB foi dividida da seguinte maneira, com base em estudos sobre a distribuição e patogenia do agente:

a) Bovinos acima de 30 meses de idade apresentando comportamento ou sinais clínicos compatíveis com a EEB (chamados de suspeitos clínicos);

São incluídos nessa categoria os bovinos acometidos por doenças refratárias a tratamentos e que apresentem mudanças progressivas no comportamento, tais como excitabilidade, coices durante a ordenha, mudanças na hierarquia do rebanho, animais que hesitam atravessar portas, porteiras ou outras barreiras, ou que apresentem sinais neurológicos sem a

manifestação de sinais de doenças infecciosas. Essas alterações de comportamento, que podem ser muito sutis, são melhor identificadas pelas pessoas que manejam os animais (como tratadores e peões).

Considerando que a EEB não apresenta sinais patognomônicos, é recomendado que os sistemas de vigilância procurem ser abrangentes e que busquem amostrar os animais que desenvolvam os sinais acima descritos. A OIE ainda recomenda que, considerando que os animais podem apresentar apenas alguns desses sinais, e que a doença pode apresentar uma graduação de severidade, todos os animais potencialmente doentes devem ser investigados (OIE, 2014).

Esta subpopulação é a que tende a exibir maior prevalência, e a sua identificação depende quase que exclusivamente da conscientização dos atores envolvidos diretamente no manejo dos animais e dos veterinários atuantes no programa de conscientização. Somando-se a isso, uma investigação de qualidade e um sistema laboratorial são essenciais para dar credibilidade a um sistema de vigilância (OIE, 2014).

b) Bovinos acima de 30 meses de idade encontrados caídos, incapazes de se levantar ou andar sem ajuda e bovinos acima de 30 meses de idade encaminhados ao abate de emergência ou condenados na inspeção *ante mortem*;

Estes animais podem ter exibido alguns dos sinais clínicos listados acima sem que estes fossem reconhecidos como compatíveis com a EEB. Pelas observações feitas nos países que diagnosticaram a doença, esta subpopulação demonstra a segunda maior prevalência, e por essa razão é a segunda população mais propícia para a detecção da EEB (OIE, 2014).

c) Bovinos acima de 30 meses de idade encontrados mortos nas propriedades, durante o transporte ou no abatedouro (*fallen stock*);

Os animais pertencentes a esta categoria, segundo a OIE, podem ter manifestado sinais clínicos de EEB antes de virem a óbito. Esta é a subpopulação que apresenta a terceira maior prevalência (OIE, 2014).

d) Bovinos acima de 36 meses de idade submetidos ao abate de rotina;

A OIE descreve que, apesar desta ser a subpopulação com a prevalência mais baixa, a realização dessa vigilância pode assessorar o monitoramento da evolução de uma possível epidemia, e da eficácia das

medidas de controle aplicadas, já que oferece o acesso contínuo a uma população de animais conhecida quanto a idade e origem geográfica. Além disso, representa uma opção de fácil acesso às autoridades sanitárias.

A estratégia deve ser elaborada de forma que as amostras sejam representativas da população bovina de um país, considerando fatores demográficos como tipo de produção e situação geográfica, bem como possíveis métodos tradicionais de criação. As hipóteses relacionadas e os procedimentos adotados devem ser detalhadamente justificados e a respectiva documentação deverá ser arquivada por pelo menos sete anos (OIE, 2014).

O sistema de vigilância epidemiológica proposto pela OIE consiste na atribuição de pontos às amostras coletadas para exames laboratoriais. Os pontos de uma amostra são determinados em função da subpopulação pertencente a essa amostra, e da idade dos animais testados, conforme a TABELA 9.

| População amostrada | | | | |
|---------------------|-----------------|--|---|--------------------|
| Idade | Abate de Rotina | Animais encontrados mortos (<i>fallen stock</i>) | Animais submetidos ao abate de emergência | Suspeitos clínicos |
| ≥ 1 e < 2 anos | 0,01 | 0,2 | 0,4 | N/A |
| ≥ 2 e < 4 anos | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 260 |
| ≥ 4 e < 7 anos | 0,2 | 0,9 | 1,6 | 750 |
| ≥ 7 e < 9 anos | 0,1 | 0,4 | 0,7 | 220 |
| ≥ 9 anos | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 45 |

TABELA 9 - VALORES EM PONTOS DAS AMOSTRAS PARA VIGILÂNCIA DE ANIMAIS DE UMA SUBPOPULAÇÃO E GRUPO DE IDADE DETERMINADOS

FONTE: OIE (2014)

As amostras podem ser coletadas com qualquer combinação de idades, mas devem refletir a demografia do rebanho do país, zona ou compartimento analisados. Além disso, os países devem amostrar pelo menos três das quatro subpopulações (OIE, 2014).

Pelo método apresentado, a vigilância tem maior enfoque na primeira subpopulação de bovinos com mais de 30 meses de idade com sinais neurológicos compatíveis com a EEB. Porém, reitera-se que a investigação

das outras subpopulações ajudará a fornecer uma avaliação mais apurada da situação da EEB no país, zona ou compartimento (OIE, 2014).

Outra ressalva feita é que os países podem também considerar, nos seus sistemas de vigilância, os animais importados de países ou zonas não livres de EEB, proles de vacas afetadas pela doença e animais que consumiram alimentos potencialmente contaminados com outros agentes de EET (OIE, 2014).

Os pontos são somados e cada país, zona ou compartimento deve atingir um total de pontos fixados, ou seja, uma meta de pontuação. Esta meta foi obtida aplicando-se a um modelo estatístico fatores que incluem uma prevalência determinada na população bovina adulta que depende do tipo de vigilância a ser aplicada.

Quanto ao tipo de vigilância, a OIE propõe duas modalidades que podem ser adotadas pelos países membros, conforme suas respectivas classificações de risco:

- a) Vigilância tipo A: permite detectar a EEB com uma prevalência de 1:100.000 na população bovina adulta, com um nível de confiança de 95%. É o tipo que deve ser empregada, pelo menos no início, em países com risco controlado para a EEB.
- b) Vigilância tipo B: permite detectar a EEB com uma prevalência de 1:50.000 na população bovina adulta, com nível de confiança de 95%. É utilizada pelos países de risco insignificante ou pelos países de risco controlado após a obtenção de pontos correspondentes a vigilância do tipo A.

A TABELA 10 apresenta a meta de pontos a ser alcançada para diferentes tamanhos da população bovina adulta. O quantitativo de pontos devem ser somados ao longo de sete anos consecutivos, de forma acumulativa.

| Tamanho da População Bovina Adulta (\geq 24 meses) | Vigilância Tipo A | Vigilância tipo B |
|---|-------------------|-------------------|
| \geq 1.000.000 | 300.000 | 150.000 |
| 800.000 - 1.000.000 | 240.000 | 120.000 |
| 600.000 - 800.000 | 180.000 | 90.000 |
| 400.000 - 600.000 | 120.000 | 60.000 |
| 200.000 - 400.000 | 60.000 | 30.000 |
| 100.000 - 200.000 | 30.000 | 15.000 |
| 50.000 - 100.000 | 15.000 | 7.500 |

TABELA 10 – META DE PONTOS PARA DIFERENTES TAMANHOS DE POPULAÇÃO EM UM PAÍS, ZONA OU COMPARTIMENTO COM ZERO CASOS E 95% DE CONFIANÇA

FONTE: OIE (2014)

Cabe esclarecer que, estatisticamente, 1.000.000 de cabeças é o ponto de corte em que o aumento da população não interfere mais na amostra a ser obtida (OIE, 2014).

Conclui-se que a Vigilância do tipo A é mais rigorosa, e uma vez cumprida, credencia o país a adotar um sistema mais brando (tipo B) em que a pontuação-alvo é exatamente a metade. A vigilância para a manutenção do risco deve ser direcionada às subpopulações que tendem a apresentar uma prevalência mais elevada (especialmente os suspeitos clínicos) (OIE, 2014).

Também é sugerido que um país projete sua estratégia de vigilância de modo a assegurar que as amostras sejam representativas dos sistemas de produção e se incluam considerações sobre fatores demográficos tais como o tipo de produção e posição geográfica, e a influência de práticas de manejo, apesar do sistema adotado não requerer informações aprofundadas (OIE, 2014).

A coleta cautelosa dos dados, segundo a OIE, pode diminuir substancialmente os custos e a quantidade de amostras necessárias, já que amostras de animais suspeitos clínicos têm maior significância para a vigilância que amostras oriundas de animais saudáveis, por exemplo.

Um método de amostragem mais intensivo deve ser usado para se determinar a prevalência da doença quando da detecção do agente. Nesse caso, o objetivo da vigilância deve ser voltado ao monitoramento da extensão e à evolução da doença, assim como avaliar a eficácia de medidas de controle tais como proibições com relação à alimentação e as ações de remoção de material de risco (MRE).

Procedimentos para reduzir a infectividade do agente da EEB nas farinhas de carne e osso (FCO)

No Artigo 11.4.19 do Código Terrestre há a descrição dos procedimentos para reduzir a infectividade do agente da EEB na FCO. Assim como as medidas de vigilância, procedimentos de mitigação de risco também são preconizados e avaliados pela OIE dentro de um Programa de Controle e Prevenção da EEB (OIE, 2014).

Recomenda-se que as FCO sejam submetidas aos seguintes processamentos:

- a) Suas partículas devem ser reduzidas ao tamanho máximo de 50 mm antes de qualquer processamento térmico;
- b) Tratamento térmico, em atmosfera saturada, que atinja a temperatura de 133°C por no mínimo 20 minutos, submetido a pressão atmosférica de 3bar.

Outros procedimentos visando a melhoria do programa de prevenção e controle da EEB também são preconizados pela OIE, como:

- a) Proibição da utilização de FCO ou outros subprodutos de ruminantes na alimentação de ruminantes;
- b) Regulamentação sobre a utilização de carcaças de ruminantes (incluindo a carcaça de animais encontrados mortos – *fallen stock*), seus subprodutos e despojos de abatedouros na produção de alimentação animal;
- c) Promoção de medidas que previnam a contaminação cruzada de alimentos para alimentação animal;
- d) Manutenção dos programas de conscientização de médicos veterinários, produtores rurais e demais trabalhadores envolvidos no manejo, transporte e abate de ruminantes, visando aumentar a sensibilização sobre a doença e consequente notificação de casos;
- e) Notificação obrigatória e investigação de todos os animais que demonstrem sinais compatíveis com a EEB;
- f) Realização de exames laboratoriais, utilizando as técnicas descritas no Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para

Animais Terrestres (OIE, 2010), utilizando SNC coletados pelo sistema de vigilância.

Testes Diagnósticos

O Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres é a bibliografia de referência em diagnósticos da OIE (OIE, 2010). Os métodos estabelecidos neste manual são resultado do entendimento dos países membros quanto às técnicas que devem ser utilizadas para fins de garantia sanitária que tenham aceitação internacional.

O capítulo 2.4.6 do Manual Terrestre estabelece que a escolha dos métodos de diagnóstico da EEB pode variar conforme o objetivo esperado, porém é recomendado o uso de dois métodos consecutivos para a confirmação de casos (OIE, 2010).

Entre os exames aceitos pela OIE para diagnóstico da EEB estão o exame histopatológico, imunohistoquímica (IHQ), Western blot (WB) e testes rápidos baseados em ELISA. A IHQ e o WB são os métodos de eleição e devem ser utilizados como provas confirmatórias preferenciais. Os testes rápidos são indicados para a etapa de triagem, embora sejam aceitos como exames confirmatórios, respeitadas algumas condições como o uso de métodos rápidos diferentes na prova de triagem e na prova confirmatória.

O exame histopatológico esteve relacionado estreitamente com a EEB desde a sua primeira descrição, entretanto, como método diagnóstico, demonstra desvantagens em relação à IHQ. O diagnóstico da EEB pode ser confirmado pelas lesões típicas da doença, embora seja recomendado empregar outra técnica, como IHQ ou WB, para confirmar o diagnóstico (OIE, 2010).

5 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB no Brasil

Atualmente no Brasil encontram-se em vigência diversos instrumentos legais que dão suporte para a vigilância epidemiológica relacionada à EEB. Desde julho de 1934, com a publicação do decreto 24.548 (BRASIL, 1934), teve-se a primeira legislação que trata da defesa sanitária animal no Brasil.

A edição e atualização de normas para a fundamentação legal do Estado quanto às ações necessárias em vigilância e defesa sanitária animal são de responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006a).

A execução das ações de defesa sanitária animal é realizada, principalmente, pelos médicos veterinários servidores do MAPA e dos Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal. Além disso, há treinamento de médicos veterinários privados para auxiliarem nas ações de vigilância da EEB (mais especificamente em relação à colheita de amostras a campo) que recebem um credenciamento junto ao Ministério (BRASIL, 2006b). Atualmente, o Brasil conta com 1.164 médicos veterinários federais, 4.156 estaduais (DSA, 2014a) e 5.744 privados credenciados e que receberam treinamento específico para coleta de material para a vigilância de EEB a campo (DSA, 2014c). Apesar do Brasil possuir a maior quantidade de médicos veterinários do mundo, totalizando 84.151 profissionais atuantes (CFMV, 2013), pouco mais de 7% (5.744) destes são credenciados pelo MAPA para desenvolverem ações de vigilância da EEB.

Em relação à EEB, as primeiras normativas para a prevenção dessa enfermidade foram Instruções de Serviço nº 01/1990 (BRASIL, 1990) seguidas de Instruções Normativas IN nº 02/1991 (BRASIL, 1991), nº 01/1992 (BRASIL, 1992) e 02/1993 (BRASIL, 1993). Todas tratavam da proibição da importação de animais vivos, produtos e subprodutos de bovinos oriundos de países que notificaram a doença. Essas várias regulamentações, com consequentes revogações e atualizações, demonstram as incertezas sobre a doença à época. Esse controle precoce das importações mostrou-se útil, mais tarde, ao submeter as importações brasileiras à análise de risco de difusão do agente (RODRIGUES, 2011).

Em 1997, pela Portaria Ministerial nº 516, tornou-se obrigatória a notificação da ocorrência ou suspeição de doenças nervosas em herbívoros (BRASIL, 1997). Além disso, esta portaria incorporou a vigilância das EET no sistema de vigilância para a raiva dos herbívoros. Dois anos depois, foi instituído o primeiro sistema de vigilância para a EEB, Instrução Normativa nº 18, de 15 de fevereiro de 2002 (BRASIL, 2002a).

A partir de 17 de setembro de 2013, a Instrução Normativa nº 44 implementou o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (PNEEB), com objetivo de gerenciamento das medidas já existentes relacionadas à doença, que será descrito a seguir (BRASIL, 2013a).

5.1 Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (PNEEB)

Os principais objetivos do PNEEB são: a prevenção da entrada do agente da EEB no território nacional, implantação de medidas de mitigação de risco e, por último, a manutenção do sistema de vigilância para detecção de animais infectados por Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) (DSA, 2014b). Os pilares do programa estão ilustrados na FIGURA 5.

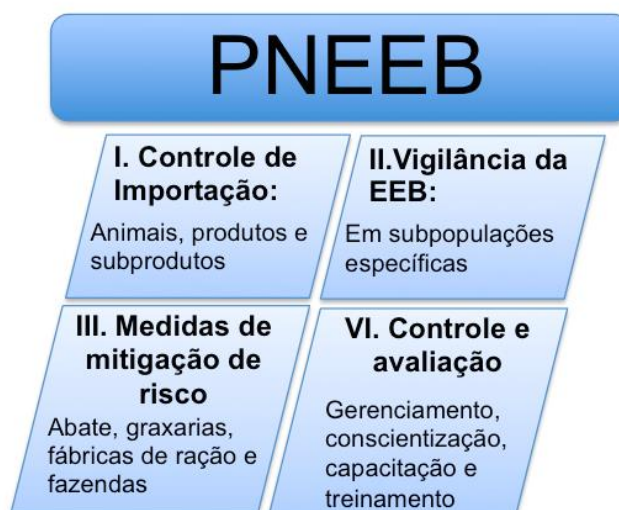


FIGURA 5 – ESTRUTURA DO PNEEB, CONFORME AS MEDIDAS SANITÁRIAS
 FONTE: DSA (2014b)

O PNEEB é dividido em 6 subprogramas, que possuem normas aplicáveis em toda a cadeia epidemiológica da EEB (FIGURA 6), sendo:

1. Controle da importação e monitoramento de bovinos importados;
2. Vigilância das EET;
3. Controle em estabelecimentos de abate de ruminantes;
4. Controle em estabelecimentos processadores de resíduos de origem animal;
5. Controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos que os fabriquem e de produtos veterinários para uso em ruminantes;
6. Controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos de criação de ruminantes.

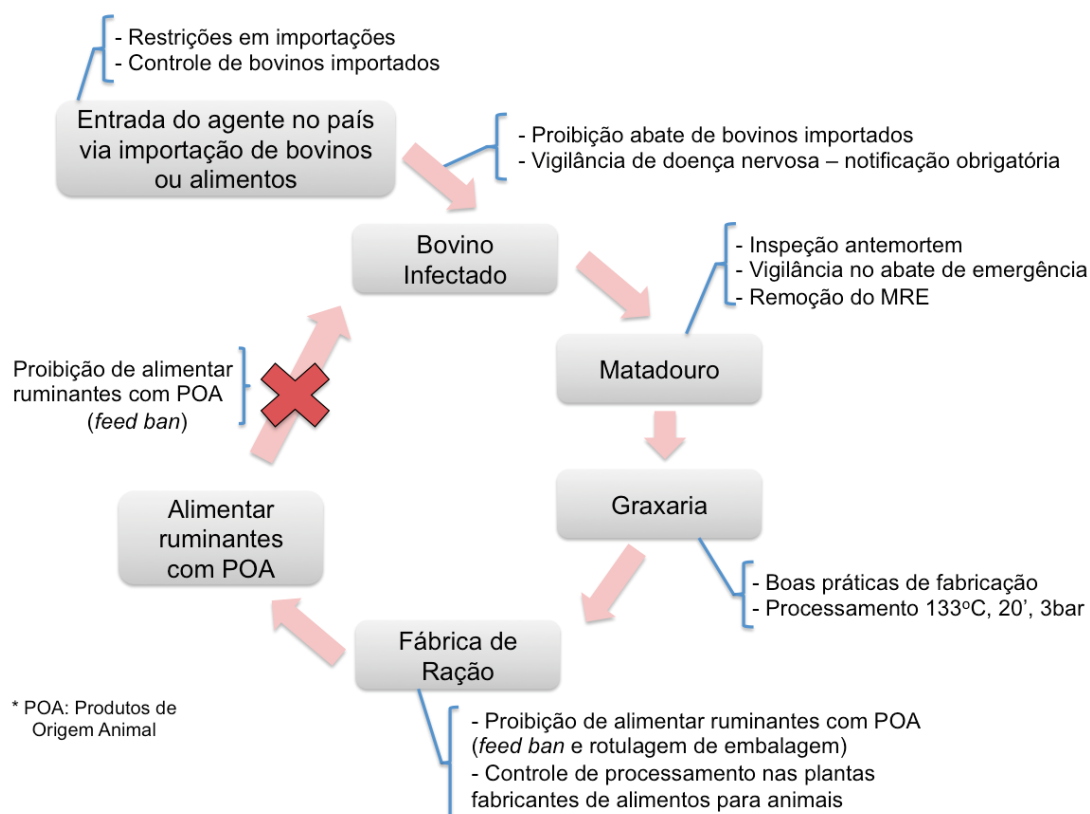


FIGURA 6 – CADEIA EPIDEMIOLÓGICA DA EEB E AS MEDIDAS DE CONTROLE EM CADA PONTO CRÍTICO DA CADEIA
FONTE: DSA (2014b)

Considerando a necessidade da preservação da saúde dos consumidores de produtos bovinos brasileiros e a importância da pecuária na economia do país, é fundamental a coesão dos setores envolvidos (oficiais e privados) no compartilhamento de responsabilidades das medidas previstas

pelo PNEEB, no sentido de manter reduzido o risco de ocorrência dessa enfermidade no Brasil (DSA, 2014b).

Os segmentos diretamente envolvidos na prevenção e vigilância da EEB são:

- a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); define, coordena, supervisiona e fiscaliza as atividades de prevenção e vigilância da EEB. Algumas ações também podem ser executadas diretamente pelo MAPA, conforme competência regimental;
- b) Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal: executam as medidas de vigilância e de fiscalização, conforme a competência. O MAPA e os Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal compõem o Serviço Veterinário Oficial (SVO);
- c) Setor Produtivo: aplica as medidas sanitárias estabelecidas pelo SVO. Nesse segmento, cabe ressaltar a importância do engajamento dos pecuaristas, dos estabelecimentos industriais da cadeia produtiva de bovinos e de médicos veterinários privados, dentre outros profissionais;
- d) Embasamento Científico: o PNEEB é alicerçado nas informações científicas emanadas por instituições de ensino e pesquisa e nas recomendações de fóruns sobre saúde animal, em nível nacional e internacional.

Política de prevenção e vigilância da EEB no Brasil

Devido a complexidade da epidemiologia da EEB, além do controle de importação e da vigilância da doença, as medidas de mitigação de risco são fundamentais para a manutenção da situação sanitária frente a esta enfermidade (DSA, 2014b). As medidas sanitárias do MAPA, inclusive as relacionadas à EEB, são instituídas por diversos instrumentos regulatórios, abrangendo documentos internos (memorando, fax, instrução de serviço, norma interna) ou externos (portaria, instrução normativa e decreto). Na TABELA 11 têm-se as principais medidas de mitigação de prevenção da EEB, conforme o ano de sua primeira adoção.

| Medida | Ano de Adoção |
|---|---------------|
| 1. Restrição de importação de bovinos de países de risco para EEB | 1990 |
| 2. Restrição de importação de farinhas de ruminantes e outros produtos de origem animal | 1990 |
| 3. Proibição de alimentar ruminantes com certos produtos de origem animal (<i>feedban</i>) | 1996 |
| 4. Notificação obrigatória de EEB e categorias de vigilância | 1996 |
| 5. Organização da rede de diagnóstico das EET | 2001 |
| 6. Monitoramento e proibição de abate de bovinos importados de países de risco para a EEB | 2001 |
| 7. Mitigação de risco - processamento de resíduos de ruminantes: esterilização de FCO (133 graus/20 min/3bar) | 2003 |
| 8. Mitigação de risco - remoção do MRE | 2005 |
| 9. Reorganização do PNEEB, com objetivo e gerenciamento das medidas de prevenção da EEB já existentes | 2013 |

TABELA 11 – ANO DE INÍCIO DAS MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA EEB NO BRASIL

FONTE: DSA (2014b)

Conforme as informações científicas sobre a EEB e as recomendações da OIE, o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da EEB (PNEEB) é estruturado em subprogramas, que serão detalhados a seguir (DSA, 2014b).

5.1.1 Controle da importação e monitoramento de bovinos importados

O subprograma de controle de importação visa prevenir a entrada do agente no País, mediante procedimentos de: controle da importação, no que concerne ao risco de veiculação do agente da EEB em animais, seus produtos e subprodutos; e monitoramento de bovinos importados, visando ao controle de localização, movimentação e destinação desses animais (BRASIL, 2013a).

Quanto a destinação de bovinos importados de países de risco para a EEB, a Instrução Normativa nº 18, de 15 de dezembro de 2003, institui a

proibição do abate e a sua inclusão na vigilância da EEB (BRASIL, 2003a). Essa mesma normativa prevê indenização ao proprietário destes animais, quando chegarem ao final de sua vida produtiva.

Em 2008, a Instrução Normativa nº 49 (BRASIL, 2008a) instaura medidas de importação de bovinos, seus produtos e subprodutos, estabelecendo as categorias de risco para a EEB sendo: categoria 1 (risco insignificante pela OIE), categoria 2 (risco controlado pela OIE) e 3 (risco indeterminado ou não classificado pela OIE).

A Instrução Normativa nº 13, de 14 de maio de 2014 atualizou as normas para identificação, monitoramento e controle da movimentação de bovinos importados de países considerados de risco para a EEB (BRASIL, 2014).

Os requisitos brasileiros para importação de animais, seus produtos e subprodutos são revisados continuamente no sentido de se adequar às recomendações da OIE (DSA, 2014b).

Estudos mostraram que as medidas de controle de importação implantadas pelo governo brasileiro, caso mantidas, serão capazes de reduzir o risco de introdução do agente da EEB ao menor nível possível em 2013 (RODRIGUES et al., 2013).

5.1.2 Subprograma de vigilância

Esse subprograma visa a detecção precoce de eventual caso de EEB, mediante procedimentos de notificação e investigação de doenças nervosas em ruminantes e a realização de testes para diagnósticos das EET em populações específicas (BRASIL, 2013a).

Conforme descrito no item 1, a OIE recomenda o direcionamento da vigilância a determinadas subpopulações de bovinos, por ser uma doença de baixa prevalência e pela ausência de diagnóstico *in vivo* (OIE, 2014).

A vigilância das doenças nervosas em herbívoros no Brasil é predominantemente direcionada à raiva, que é uma doença considerada endêmica no país (DSA, 2014b). Assim, entendeu-se que o sistema de vigilância já implantado para a raiva seria aplicável à vigilância da EEB, pela capilaridade nacional, pela sensibilidade para detecção de doenças nervosas

em geral e por sua consolidação no sistema produtivo brasileiro (DSA, 2014b). Dessa forma, em 25 de fevereiro de 2002 a IN nº 5 atualizou a inclusão da vigilância da EEB, scrapie e outras doenças de caráter progressivo no sistema de vigilância da raiva dos herbívoros (BRASIL, 2002b).

A vigilância epidemiológica da EEB é realizada pelo SVO e por médicos veterinários privados, sendo que esses últimos devem reportar ao Serviço Oficial todas as suspeitas de doenças nervosas que vierem a ter conhecimento (DSA, 2014b).

O SVO, quando notificado da suspeita de ocorrência de síndromes nervosas em herbívoros deverá atendê-la em 24 horas. Sempre que possível, deverá ser coletado material para diagnóstico laboratorial, sendo o tronco encefálico acondicionado em formol, e as demais porções sob refrigeração, conforme preconizado pelo Manual de Procedimentos para o Diagnóstico de Doenças Nervosas do Sistema Nervoso Central de Bovinos (BARROS, 2003). Os documentos que deverão ser preenchidos e que fornecerão subsídios para futuras investigações são o FORM IN (Formulário de Investigação de Doenças – Inicial) e o FORM SN (Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica) (BRASIL, 2013b) (ANEXO I).

Inicialmente, a IN nº 18, de 15 de fevereiro de 2002, estabeleceu os procedimentos de vigilância epidemiológica para a EEB, especialmente na determinação das categorias de vigilância (BRASIL, 2002a). No final de 2012, o Memorando Circular nº 73 (BRASIL, 2012) atualizou essas categorias, que atualmente são direcionadas a bovinos e bubalinos que:

- a) Tem idade superior a 24 meses, com sinais clínicos de doença nervosa;
- b) Tem idade superior a 24 meses, com doença crônica, caquetizante ou depauperante;
- c) Tem idade superior a 24 meses, em decúbito ou que não se locomovem sem ajuda;
- d) Tem idade superior a 24 meses, encontrados mortos na fazenda, durante o transporte ou no matadouro, sem apresentar previamente sinais relacionados as categorias a), b) e c);

- e) Tem idade superior a 3 anos, submetidos ao abate de emergência ou condenados na inspeção *ante mortem* e que não se enquadram nas categorias a), b) e c);
- f) Sejam importados de países considerados de risco para a EEB, e que não se enquadraram nas categorias a), b), c) e d) – essa categoria foi incluída em 2003, pela IN nº 18 (15/12/2003);
- g) Tem idade superior a 24 meses, com vínculo epidemiológico, de investigação de EEB;
- h) Negativos para a raiva no teste de imunofluorescência.

As amostras encefálicas provenientes dessas subpopulações são enviadas a um laboratório indicado pelo MAPA para o diagnóstico da EEB (BRASIL, 2012).

Diagnóstico laboratorial

As normativas brasileiras que regem os protocolos e técnicas laboratoriais seguem o preconizado pelo Manual Terrestre da OIE (OIE, 2010). Dessa forma, os procedimentos para credenciamento de laboratórios para o teste das EEB pela técnica de histopatologia e imunohistoquímica foram instituídos pelas IN nº 15, de 15 de fevereiro de 2002 (BRASIL, 2002b) e IN nº 36, de 05 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007a), respectivamente.

Atualmente, o Brasil conta com apenas um laboratório credenciado para a realização de provas de IHQ, que recebem amostras de todo o país: o Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) em Recife/Pernambuco (MAPA, 2014).

Não há normativas que contemplem a utilização de testes rápidos e Western blot para diagnóstico da EEB no Brasil.

5.1.3 Subprograma de controle em estabelecimentos de abate de ruminantes

Esse subprograma visa à redução de risco de um eventual ingresso do agente da EEB na cadeia de abate/alimentação, mediante: retirada de materiais de risco específicos (MRE) da carcaça de bovinos, que não podem ser destinados à alimentação humana e animal; e realização de vigilância em

ruminantes submetidos ao abate de emergência ou encontrados mortos em matadouros ou no desembarque do matadouro (BRASIL, 2013a).

Tanto a remoção do material de risco específico, quanto à vigilância no abate de emergência só tem abrangência para os frigoríficos sob Inspeção Federal (SIF), não atingindo os frigoríficos sob inspeção estadual (SIE) e municipal (SIM). Alguns estados podem ter legislações próprias, em consonância à legislação do SIF, abrangendo os frigoríficos sob inspeção estadual (SIE). Porém, tratando-se de frigoríficos sob Inspeção Municipal (SIM), não há qualquer indicação para a realização desse subprograma.

5.1.3.1 Remoção do material de risco específico

A remoção do MRE foi primeiramente implantada pelo Memorando Circular CGI/DIPOA nº 02 de 07 de abril de 2005 (BRASIL, 2005). Segundo o referido documento, que foi alicerçado nos pareceres exarados pelo Comitê Científico Consultivo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, nomeado pela Portaria SDA nº 14 de 15 de março de 2002 (BRASIL, 2002c), os materiais considerados de risco para a EEB incluíam o cérebro, olhos, amídalas, baço, medula espinhal e intestino (desde o duodeno até o reto), de bovinos, ovinos e caprinos de qualquer idade. Esses materiais deveriam ser removidos, não podendo compor matéria-prima para farinha de carne e ossos (BRASIL, 2005).

Esse Memorando Circular foi revogado, e atualmente está em vigência o Memorando Circular CGI/DIPOA nº 1, de 23 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007b) que instaura as diretrizes para a remoção, segregação e destinação dos materiais de risco específico (MRE) para a EEB. Apesar do objetivo geral desse documento é que estes procedimentos sejam adotados pelos estabelecimentos brasileiros de abate de ruminantes, seu formato (Memorando Circular) não tem peso de normativa/lei, o que restringe a obrigatoriedade de cumprimento apenas àqueles estabelecimentos sob fiscalização federal (SIF).

Como objetivo específico está a padronização dos procedimentos a serem adotados no âmbito do abate de ruminantes e visa impedir a

introdução do MRE na cadeia alimentar de ruminantes diretamente ou através de produtos derivados como farinha e sebos.

Dessa forma, são considerados MRE o encéfalo, olhos, tonsilas, medula espinhal e parte distal do íleo (BRASIL, 2007b).

5.1.3.2 Vigilância em bovinos encaminhados ao abate de emergência

A Instrução de serviço conjunta DDA/DIPOA nº 02 de 15 de agosto de 2003 implantou os primeiros critérios para a colheita e envio de tronco encefálico para a vigilância da EEB em frigoríficos (BRASIL, 2003b).

Atualmente, o documento vigente que rege tais procedimentos é o Memorando CGI/DIPOA nº 124/2010 – Circular, de 17 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010), que determina que todos os ruminantes submetidos ao abate de emergência mediata ou imediata, os que chegam mortos ao estabelecimento e os que morrem nos currais devem ter os troncos encefálicos coletados e encaminhados para a análise laboratorial.

Procedimentos de coleta

Os procedimentos de coleta, acondicionamento, identificação e envio dos troncos encefálicos e demais materiais para diagnóstico diferencial estão descritos no Manual de Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos (BARROS et al., 2003).

Seguindo as instruções do Manual, os troncos encefálicos deverão ser coletados com o uso de uma colher específica (FIGURA 7), e imediatamente acondicionados em frascos de “boca larga” com formol a 10%, devidamente identificados por meio de etiquetas. As amostras deverão ser acompanhadas pelo formulário de abate de emergência, que deve ser preenchido com informações sobre o quadro clínico, quando for o caso, a idade aproximada do animal em anos (identificada por meio da cronologia dentária) e as demais informações solicitadas.



FIGURA 7 – COLHER UTILIZADA PARA A COLHEITA DE TRONCO ENCEFÁLICO DE BOVINOS
FONTE: A autora (2014)

O formulário de colheita e envio de amostras de tronco encefálico oriundo do abate de emergência foi instituído pelo Memorando CGI/DIPOA nº 124/2010 – Circular (BRASIL, 2010), e pode ser visualizado no ANEXO II.

5.1.4 Subprograma de controle em estabelecimentos processadores de resíduos de origem animal

Este subprograma visa mitigar o risco da presença do agente da EEB nas farinhas oriundas de ruminantes, mediante os seguintes procedimentos preconizados pela OIE: redução das partículas a um tamanho máximo de 50mm antes de ser submetida a tratamento térmico; processamento, em atmosfera saturada com vapor, em temperatura mínima de 133°C, por no mínimo 20 minutos a uma pressão absoluta de 3bar; e proibição de integrar MRE nessas farinhas (OIE, 2014).

Nesta linha, a IN nº 34 de 28 de maio de 2008, que atualizou os procedimentos de boas práticas de fabricação (BPF) em estabelecimentos processadores de resíduos animais (graxarias), com destaque para o processamento de FCO de ruminantes (BRASIL, 2008b).

5.1.5 Subprograma de controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos que fabriquem e de produtos veterinários para uso em ruminantes

Este subprograma visa reduzir o risco de contaminação de alimentos para ruminantes ou produtos veterinários para esses animais, com o agente da EEB, mediante procedimentos de: inspeção e fiscalização dos estabelecimentos que produzem alimentos destinados a ruminantes e monitoramento dos seus produtos; e controle da produção, comercialização e da utilização de produtos veterinários destinados a ruminantes visando prevenir a contaminação com produtos de origem animal proibidos (DSA, 2014).

A função principal desse subprograma é não permitir a reciclagem do agente na cadeia alimentar de bovinos. Nesse sentido, algumas terminologias são amplamente utilizadas como “*feed ban*”, já citada anteriormente, que se trata da proibição de alimentar bovinos com farinha de carne e ossos (FCO) de animais, e contaminação cruzada (CC), que está relacionada à contaminação acidental do alimento do bovino com alimentos destinados a outros animais e que contêm FCO em sua fórmula.

A primeira normativa que trata do controle na produção de alimentos foi a Instrução Normativa nº 69, de 23 de setembro de 2003, que aprovou a padronização da metodologia para detecção de subprodutos de origem animal em misturas de ingredientes para alimentação de ruminantes por microscopia (BRASIL, 2003c). Essa norma permitiu que laboratórios realizassem análises buscando detectar a presença de subprodutos de origem animal proibidos na alimentação de ruminantes, o que serve de base identificar a CC e para a tomada de medidas fiscais.

Em relação à proibição da utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes (*feed ban*), a primeira legislação que tratou do assunto foi a Portaria nº 365, de 03 de julho de 1996 que determinava que ruminantes não fossem alimentados com proteínas de origem de animais destas espécies (BRASIL, 1996). A legislação atual que trata do tema é a IN nº 08 de 25 de março de 2004. Ela atualiza essa proibição, ampliando a para proteínas de origem animal (e não só proteínas de ruminantes), e exclui certos produtos como lácteos, farinha de ossos calcinada e produtos

derivados de peles e couros (BRASIL, 2004). Além disso, em relação aos estabelecimentos produtores de alimentos para animais, essa norma estabelece uma rotulagem de advertência em alimentos destinados a não ruminantes e que contenham produtos de origem animal, contendo os seguintes dizeres: “Proibido na alimentação de ruminantes”.

Em 2007, foi publicada a IN nº 04 (BRASIL, 2007c) que estabelece o regulamento técnico de boas práticas de fabricação (BPF) de produtos destinados a alimentação animal. Nesse mesmo ano foi aprovada a regulamentação da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974 (BRASIL, 1974), que torna obrigatória a inspeção e vigilância nos produtos destinados à alimentação animal e estabelece outras providências (Decreto nº 6926 de 11/12/2007) (BRASIL, 2007d).

Em relação à prevenção da contaminação cruzada, a IN nº 17, de 7 de abril de 2008, proíbe a fabricação, na mesma planta industrial, de produtos destinados à alimentação de ruminantes e não ruminantes (BRASIL, 2008c).

5.1.6 Subprograma de controle da produção de alimentos para ruminantes em estabelecimentos de criação de ruminantes

Além das normativas relacionadas ao controle da produção de alimentos, contidas no item 5.1.5, outras medidas para o fortalecimento do *feed ban* foram adotadas pelo Governo Brasileiro, como o controle da produção de alimentos nos estabelecimentos de criação (DSA, 2014b).

Este subprograma visa prevenir a contaminação de alimentos destinados aos ruminantes nos estabelecimentos de criação desses animais, mediante a fiscalização e coleta de amostras nestes locais.

Em obediência a IN nº 08/2004, que implementa a proibição da utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes, desde 2004 o SVO realizava fiscalizações rotineiras em propriedades rurais, buscando indício do uso de produtos proibidos na alimentação dos rebanhos (BRASIL, 2004). Quando havia indício de tal infração, amostras eram coletadas e encaminhadas ao laboratório oficial, para a realização de provas que identificassem o conteúdo daquele alimento (BRASIL, 2003c).

Somente em 2009 houve uma padronização dos procedimentos de fiscalização de alimentos para ruminantes em estabelecimentos de criação, pela publicação da IN nº 41, em 10 de outubro de 2009 (BRASIL, 2009). Além disso, ela estabeleceu a destinação dos ruminantes alimentados com produtos proibidos. Assim, caso haja a comprovação (laboratorial) de que o alimento consumido pelos ruminantes continha subprodutos proibidos no ato da fiscalização, estes animais deverão ser encaminhados ao abate, em estabelecimentos com serviço de inspeção oficial que faça a remoção do MRE, no prazo máximo de 30 dias após o resultado final. Esse prazo poderá ser prorrogado, mediante procedimentos específicos, a critério do SVO, baseando-se na Instrução Normativa nº 42 (BRASIL, 2011).

Para o sucesso desse subprograma, além das fiscalizações promovidas pelo SVO, é imprescindível a participação efetiva do setor produtivo, visando a conscientização dos produtores rurais quanto a adoção de boas práticas de alimentação dos ruminantes, visando evitar o fornecimento de subprodutos de origem animal proibidos, e a contaminação cruzada dos ingredientes na propriedade rural (DSA, 2014b).

6 Sistema de Vigilância e Prevenção da EEB nos Estados Unidos

O Departamento de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agriculture* - USDA), criado em 1862 pelo presidente Abraham Lincoln, é responsável por supervisionar o setor agrícola estadunidense. Entre os deveres do USDA estão ajudar os agricultores com subsídios de apoio aos preços, a inspeção de alimentos para garantir a segurança alimentar e garantir a sanidade dos rebanhos.

Está dividido em Agências ou Escritórios, sendo os mais relevantes, quando se trata do sistema de vigilância da EEB, as seguintes agências:

a) *Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS): criada em 1972, é uma agência multifacetada com uma ampla atuação, que incluem a proteção e promoção da sanidade agropecuária dos Estados Unidos. Dentro da sua estrutura organizacional, tem-se várias unidades operacionais de programas. Dentre elas, destaca-se a chamada *Veterinary Services* (VS), que

objetiva proteger e melhora a saúde, qualidade e comercialização de animais, produtos animais e produtos biológicos veterinários, através da execução das ações de prevenção, controle e/ou eliminação de doenças dos animais.

Uma das características do APHIS/VS é que os programas sanitários não são executados apenas (ou em sua maioria) pelo corpo técnico dessa agência. Isso porque, desde 1921, o USDA estabeleceu um Programa de acreditação de médicos veterinários privados para que estes auxiliem os colegas do serviço oficial no controle de doenças no rebanho. Os veterinários acreditados trabalham em cooperação com o APHIS para aumentar a sanidade, qualidade, produtividade e competitividade da pecuária dos EUA, baseando-se na prevenção, controle e erradicação de doenças nos rebanhos bovinos e demais espécies (USDA, 2010).

Para o USDA, os veterinários acreditados são a primeira linha de defesa para garantir a sanidade pecuária nacional. Dessa forma, mais de 80% dos médicos veterinários atuantes nos EUA (cerca de 71 mil) são acreditados pelo APHIS para desenvolver ações de defesa sanitária animal. (USDA, 2010).

b) *Food Safety and Inspection Service (FSIS)*: é a agência responsável por garantir a segurança alimentar dos alimentos. Realiza os procedimentos atinentes a inspeção de produtos de origem animal.

Além do USDA, o HHS (*United States Department of Health and Human Services*) também desempenha ações dentro do programa da EEB, mais precisamente em relação a fiscalizações em fábricas que produzem alimentos para ruminantes. Neste Departamento, o FDA (*Food and Drug Administration*) normativa e coordena várias ações que são consideradas como medidas de mitigação de risco para a doença.

Em relação à EEB, o USDA tem tomado medidas para prevenir a introdução e potencial difusão do agente, e tem realizado vigilância desde 1990 para monitorar a eventual presença da doença. A vigilância foi expandida tanto em escopo quanto em intensidade após a confirmação da EEB em uma vaca importada no ano de 2003 (USDA, 2003).

Esse reforço na vigilância foi realizado visando estimar o nível da presença da doença nos EUA e prover dados para delineamento de um plano

de vigilância de longo prazo. Além da vigilância epidemiológica, os Estados Unidos adotou medidas visando a prevenção e controle da doença, como:

- a) Controle de importação de bovinos vivos e seus subprodutos;
- b) Proibição da utilização de proteína de mamíferos na alimentação de ruminantes (*feed ban*);
- c) Controle e tratamento de subprodutos de origem animal;
- d) Controle nos estabelecimentos de produção de alimentos para ruminantes;
- e) Remoção e destruição de materiais de risco específico (MRE) para a EEB.

Todas essas medidas serão detalhadas a seguir.

6.1 Controle de importação de bovinos vivos e seus subprodutos

Em 1989, os Estados Unidos iniciou uma série de restrições a importações de bovinos vivos e subprodutos oriundos de países com casos autóctones de EEB (USDA, 1989). Assim, quando um país reportava a doença aos organismos internacionais, ele era automaticamente incluído na lista de países com restrições de comércio. Em 2005 e 2007 foram publicadas regulamentações proibindo a importação de bovinos vivos e subprodutos do Canadá, devido a ocorrência da doença nesse país. O objetivo dessa restrição era prevenir a exposição dos rebanhos americanos ao agente da EEB.

6.2 Proibição da utilização de proteína de mamíferos na alimentação de ruminantes (*feed ban*)

A proibição da utilização de proteínas de mamíferos na alimentação de ruminantes (*feed ban*) foi regulamentada em 4 de agosto de 1997 (FDA, 1997). Essa regulamentação, contudo, não proíbe a utilização destas proteínas na alimentação de não ruminantes. Desta forma, é necessário que os estabelecimentos que produzem alimentos para ruminantes tenham controles para prevenir a contaminação cruzada com ingredientes destinados a alimentação de não ruminantes.

Por essa razão, mais de 98% dos estabelecimentos produtores de alimentos para ruminantes não utilizam, na mesma planta de produção, matéria-prima com proteína animal (USDA, 2011). A inspeção desses estabelecimentos e a regulamentação que implementa o *feed ban* são coordenadas pelo FDA e por controles de alimentação animal estaduais.

Outra característica importante é que nos EUA, menos de 1% das rações para animais contem proteínas de origem animal (de ruminantes ou não ruminantes). Segundo o Requerimento para Melhoria de Classificação de Risco para a EEB, encaminhado por este país à OIE em 2011 (USDA, 2011), a abundância e baixo custo de matérias-primas de origem vegetal no país favorecem o uso destes ingredientes, em detrimento ao uso de produtos de origem animal. Essa característica reduz significativamente o potencial de exposição dos ruminantes ao agente da EEB.

Contudo, é permitido o processamento industrial de animais encontrados mortos ou caídos em propriedades rurais. Há serviços que coletam essas carcaças e as encaminham para produção de farinhas, que são matéria-prima para rações. Em 2010, cerca de 23% dos aproximadamente 4,2 milhões de bovinos encontrados mortos (*fallen stock*), foram encaminhados para processamento em graxarias com destino a produção de ração para não ruminantes (JEKANOWSKI, 2010). Os 77% restantes não foram recolhidos e processados, sendo provavelmente enterrados na própria propriedade ou submetidos à compostagem.

6.3 Controle e tratamento de subprodutos de origem animal

Nos EUA, as graxarias podem estar localizadas dentro dos estabelecimentos de abate, no mesmo espaço físico; estar em outra edificação, mas receber despojos de frigoríficos; e também podem ser independentes e receber animais encontrados mortos em propriedades rurais, ou miudezas oriundas de abates em pequena escala (USDA, 2011).

Os parâmetros para o processamento dos materiais nas graxarias não são limitados. A redução da infectividade de acordo com o sistema de tratamento utilizado nas graxarias baseia-se em estudos científicos sobre a redução da infectividade do príon nesses estabelecimentos (TAYLOR et al.,

1995b). Dessa forma, as atuais medidas adotadas nestes estabelecimentos visam reduzir a infectividade do agente para 1,4 log. Dessa forma, cálculos demonstram que, se houver a entrada/aparecimento do príon da EEB numa graxaria, haveria 96% de chance dele ser destruído neste estabelecimento, baseando-se nas medidas hoje adotadas para mitigação de risco (COHEN et al., 2006).

6.4 Controle nos estabelecimentos de produção de alimentos para ruminantes

As plantas que processam alimentos para animais utilizam majoritariamente matérias-primas de origem vegetal. Dados do USDA (ERS/USDA, 2010) mostraram que, em 2010, apenas 1,33% das rações produzidas no país continham subprodutos de origem animal. Se retirarmos a farinha de peixe e leite, esse percentual cairia para aproximadamente 1%.

Medidas para prevenir a contaminação cruzada (CC)

Desde 1997, com a regulamentação do *feed ban*, já estavam previstas ações de prevenção à contaminação cruzada em plantas de produção de alimentos para ruminantes (FDA, 1997). Os estabelecimentos previnem a CC utilizando equipamentos separados ou adotando medidas de limpeza para evitar a contaminação dos alimentos destinados a ruminantes.

Apesar da permissão da utilização de medidas de limpeza, mais de 98% das fábricas dos EUA utilizam plantas de produção separadas. Ou muitos estabelecimentos simplesmente não utilizam qualquer subproduto de origem animal proibido para ruminantes (USDA, 2011).

A produção separada, quando utilizada, consiste na produção em instalações separadas, assim como estocagem em containers, e linhas de produção separadas.

Já os estabelecimentos que adotam processos de limpeza (menos de 2%) devem ter os procedimentos descritos e seguir a legislação pertinente (FDA, 2003a).

Programa de fiscalização para garantia do feed ban em ruminantes

A FDA reforçou as normas relativas ao controle de alimentos para ruminantes e é o órgão responsável pela inspeção dos estabelecimentos que fabricam e processam esses produtos. Para esse fim, ele trabalha em parceria com as agências estaduais que regulam os alimentos e ingredientes em seus Estados. Isso é feito por vários mecanismos formais como termos de cooperação, contratos, convênios, e também por mecanismos informais (USDA, 2011).

Todas as atividades relativas ao *feed ban*, incluindo inspeções, investigações, e reforço nas atividades são coordenadas pelo FDA e órgãos estaduais oficiais e, em alguns casos, serviços veterinários estaduais (USDA, 2011).

O FDA disponibiliza um guia detalhando o processo de fiscalização em consonância com a legislação vigente, que serve como base, tanto para os servidores da FDA quanto aos parceiros, para as auditorias em estabelecimentos que processam alimentos para animais (FDA, 2003a).

Em relação a EEB, há um checklist específico que fornece uma lista extensa de questões que devem ser feitas pelos inspetores, auxiliando nas ações (FDA, 2003b).

Os principais objetivos do programa de inspeção, iniciado pelo FDA no final dos anos 90, eram a inspeção visual do processo de produção, verificação dos registros e esclarecimento dos procedimentos, como amostragem e análises (USDA, 2011).

A observância, por parte da iniciativa privada, das regulamentações do *feed ban* pode ser atribuída ao alto grau de interesse das empresas do ramo em seguir as regras e cooperar com o FDA e inspetores estaduais. Outro fator que contribui para isso são os grandes esforços, durante anos, na educação e conscientização da cadeia produtiva, além da transparência na obtenção das informações (que sempre estão disponíveis no endereço eletrônico do FDA) (USDA, 2011).

6.5 Remoção e destruição de materiais de risco específico (MRE)

Uma das primeiras medidas de segurança alimentar implementadas pelos EUA, visando proteger seus consumidores, foi a exclusão de animais encaminhados ao abate de emergência para o consumo humano (FSIS, 2004a)

Em 12 de janeiro de 2004, o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal dos EUA - FSIS (*Food Safety and Inspection Service*) publicou uma legislação bastante ampla, intitulada: “Proibição do Uso de Materiais de Risco Específico na Alimentação Humana e Procedimentos de destinação de bovinos caídos – condenados”. Nessa norma, o FSIS determinou que certos tecidos seriam considerados MRE e determinou sua proibição na alimentação humana (FSIS, 2004b). Em 13 de julho de 2007, houve a publicação da regulamentação final que trata da remoção e destruição do MRE (FSIS, 2007).

Em consonância com as normativas do USDA, o FDA publicou em 14 de julho de 2004 uma normativa que proíbe o uso de MRE em cosméticos e produtos comestíveis que são regulados por esta Agência (FDA, 2004).

Os materiais de risco específicos (MRE) definidos pelo USDA são: encéfalo, crânio, olhos, gânglio trigêmeo, medula espinhal, coluna vertebral (excluindo as vértebras da cauda, o processo transversal das vértebras torácicas e lombares, e as asas do sacro), e o gânglio da raiz dorsal de todos os bovinos acima de 30 meses, e as tonsilas e porção distal do íleo dos bovinos de qualquer idade (FSIS, 2007). Os MRE são proibidos na alimentação humana e devem ser destinados a procedimentos de condenação, juntamente com outros produtos derivados de bovinos (FSIS, 2007).

Adicionalmente, a carne mecanicamente separada de bovinos também é declarada como não comestível, e seu uso é proibido na alimentação humana (FSIS, 2011). Os estabelecimentos de abate ou de processamento de carcaças de bovinos devem implementar e ter procedimentos detalhados sobre a remoção, segregação e destinação do MRE. Eles também são obrigados a incluir esses procedimentos nos programas de análise de riscos

e pontos críticos de controle (HACCP), procedimentos de limpeza e desinfecção e outras determinações (FSIS, 2007).

O destino do MRE está disposto na normativa 9 CFR parte 314 (FSIS, 2014) que trata dos procedimentos de incineração, desnaturação e outros procedimentos aprovados pelo FSIS.

O propósito dos métodos de destruição previstos nessa normativa é garantir que esses materiais não sejam utilizados na alimentação humana. Após os processos de destruição, o produto restante é destinado de acordo com leis federais, estaduais ou locais, dependendo de cada caso (USDA, 2011).

Em relação à alimentação animal, os MRE são proibidos desde o início das leis sobre o *feed ban* (FDA, 1997). Em 2008, o FDA publicou uma norma final intitulada “Substâncias proibidas para a alimentação animal”, que começou a ser aplicada em 27 de abril de 2009 (FDA, 2008). Antes dessa data, os MRE e outros produtos não comestíveis podiam ser utilizados para a produção de ração para não ruminantes. Essa norma proibiu o uso do encéfalo e da medula espinhal de bovinos acima de 30 meses, além de outros materiais contendo esses tecidos, na alimentação animal (esses subprodutos são conhecidos como Materiais Bovinos Proibidos na Alimentação Animal, na sigla em inglês: *CMPAF- Cattle Materials Prohibited in Animal Feed*). Essa regulamentação ainda exige que os estabelecimentos de abate segreguem o *CMPAF* do material a ser utilizado para alimentação animal (FDA, 2009).

Adicionalmente, é proibida a insensibilização de bovinos utilizando ar comprimido no abate, também o uso de certos tecidos na recuperação avançada de carnes (FSIS, 2004a).

6.6 Programa de Vigilância Epidemiológica da EEB (*BSE Surveillance Program*)

O programa tem o objetivo de permitir a detecção de um animal infectado para cada milhão de bovinos adultos, com alto nível de confiança, mantendo níveis de vigilância superiores aos níveis preconizados internacionalmente. Possui ênfase na colheita de amostras a partir de

subpopulações de risco para a EEB, além de manter as colheitas de amostras de todas as fontes importantes de vigilância (APHIS, 2006a).

O programa segue o modelo de sistema de vigilância estabelecido pelo Serviço de Inspeção em Saúde Animal e Vegetal dos Estados Unidos - APHIS (*Animal and Plant Health Inspection Service*), o Serviço Veterinário - VS (*Veterinary Service*) e a Unidade Nacional de Vigilância – NSU (*National Surveillance Unit*) (APHIS, 2006a).

A vigilância ativa foi iniciada em 1990 nos EUA. Em resposta à identificação de um bovino importado positivo para a EEB em dezembro de 2003 (USDA, 2004), houve uma melhoria no programa de vigilância da EEB, a partir de junho de 2004 (APHIS, 2006a). Apesar dos esforços, dois novos casos de EEB foram identificados em março de 2006. Em ambos os casos, tratavam-se de bovinos de corte com mais de 10 anos de idade (nascidos após o *feed ban*, em 1997), um localizado no Texas (USDA, 2005), e outro no Alabama (USDA, 2006).

As amostras para diagnóstico poderão ser coletadas por veterinários acreditados, por veterinários do Serviço de Inspeção Alimentar (FSIS), veterinários dos laboratórios de diagnóstico oficiais ou particulares, e médicos veterinários privados qualificados pelo VS (incluindo técnicos em saúde animal, e demais envolvidos na coleta de dados) (APHIS, 2006a).

As amostras serão testadas para EEB através de uma cooperação entre o Serviço Veterinário Laboratorial Nacional – NVSL (*National Veterinary Laboratorial Service*) e laboratórios de diagnóstico particulares contratados (seriam os laboratórios credenciados no Brasil). Os exames com resultado positivo serão confirmados no laboratório oficial do NVSL. A Associação Americana de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário – AAVLD (*American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*) credencia laboratórios para participarem da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Animal - NAHLN (*National Animal Health Laboratory Network*) que podem ser contratados pelo Serviço Veterinário Laboratorial Nacional para a realização de testes de triagem para EEB, de acordo com protocolos de qualidade determinados pelo NVSL (APHIS, 2006a).

O treinamento para colheita de amostras será realizado por um escritório veterinário particular, dentro de uma área veterinária responsável -

AVIC (*Area Veterinarian in Charge*), supervisionada por um escritório regional do VS. O treinamento sobre como inserir os dados no sistema de vigilância será completado pelo BSE *help desk* (APHIS, 2006a).

A avaliação da qualidade dos dados, da análise dos dados e sua interpretação será finalizada pelo NSU, pelo gerente do programa das EET no SV, e pelos epidemiologistas do SV. A publicação e divulgação dos resultados da vigilância da EEB são de responsabilidade primária do NSU. Além disso, o NSU irá revisar a efetividade do sistema de vigilância. O NVSL será responsável pela garantia da qualidade dos resultados laboratoriais (APHIS, 2006a).

A população-alvo de Vigilância Contínua consiste de bovinos de qualquer raça ou sexo que apresentam sinais clínicos de acordo com os seguintes critérios:

1. Bovinos de qualquer idade com sinais clínicos nervosos:

Essa categoria inclui bovinos exibindo sinais compatíveis com desordens do SNC (incluído animais negativos ao teste de raiva).

Adicionalmente, essa categoria inclui bovinos altamente suspeitos de EEB indicados pelo memorando VS 580.16 (APHIS,2006b), que inclui:

a) bovinos doentes que são refratários a tratamentos (incluindo anorexia, caquexia, pneumonia, queda na produção leiteira) e com mudanças comportamentais progressivas (incluindo nervosismo, apreensão, excitabilidade, agressividade, hipermetria, chutes enquanto é ordenhado, dificuldade de levantar, prurido excessivo, dificuldade em atravessar barreiras ou portas; b) bovinos demonstrando sinais neurológicos progressivos que não podem ser atribuídos a doença e não respondem a tratamento.

2. Bovinos acima de 30 meses de idade condenados durante a inspeção *antemortem* ou que foram excluídos do abate devido a baixo status corporal (moribundo).

Esta categoria inclui:

a) Bovinos condenados pelo Serviço de Inspeção durante o exame *antemortem* por qualquer razão (que não sinais clínicos nervosos compatíveis ou não com a raiva);

- b) Bovinos sem histórico de sintomatologia nervosa cuja amostra foi coletada em propriedades rurais, clínicas veterinárias, ou em leilões, ou animais encontrados caídos, mortos ou que apresentaram sinais clínicos que podem ser associados a EEB. Para esses animais que vieram a óbito antes da chegada do serviço veterinário que realizaria a coleta de amostra, qualquer histórico clínico deve ser avaliado antes de considerar que o óbito deveu-se a uma causa não conhecida (APHIS, 2006a);
- c) Bovinos encaminhados a necropsia como diagnóstico auxiliar sem histórico de sintomatologia nervosa, porém que puderam ter sinais clínicos compatíveis com EEB (APHIS, 2006a);
- d) Bovinos encaminhados a graxaria ou graxarias independentes (que recolhem animais mortos ou moribundos), que estão doentes, depauperados ou mortos. A existência de histórico clínico é desejável para essas amostras, porém não é obrigatório. Essa categoria está limitada ao número máximo de cinco mil amostras/ano (APHIS, 2006a).

É esperado que haja uma maior proporção de suspeitos clínicos, em relação às demais categorias de vigilância. Assim, considerando que a categoria de vigilância descrita no item d) geraria a maior parte das amostras, limitou-se ao número de 5 mil amostras dessa categoria por ano, para garantir a proporção maior para as amostras de suspeitos clínicos (APHIS, 2006a).

Os esforços do programa de vigilância da EEB americano tem sido sempre focado nesses três tipos de vigilância onde a EEB é mais comumente encontrada – suspeitos clínicos, abate de emergência e animais caídos (APHIS, 2006a).

Os locais onde ocorrem as coletas de amostras, dentro de um plano amostral, devem contemplar todas as categorias de animais dos EUA, e ter representatividade nacional (APHIS, 2006a). Em combinação, essa fonte de dados fornece a oportunidade de amostrar animais de diferentes partes do país, e de vários segmentos industriais:

- a) Há plantas de frigoríficos espalhadas em todo o território nacional. Adicionalmente, estados do Oeste que não tem plantas frigoríficas ou que tem produção extensiva onde podem não observar animais caídos, submetem seu animais à inspeção pelo FSIS em outros estados (APHIS, 2006a);
- b) Instalações de processamento estão localizadas em todo os EUA. Algumas dessas instalações extraem as mesmas populações que se tem num frigorífico, pois tem instalação de eliminação para as miudezas e animais condenados (graxaria). Focando nessas instalações, ou outras instalações de processamento, em regiões geográficas onde há oferta limitada de alternativas, elas auxiliam a garantir uma ampla representatividade geográfica. A inclusão dessas instalações amplia a vigilância da categoria “encontrados mortos” (APHIS, 2006a);
- c) Amostras coletadas a campo – são aquelas coletadas aonde reside o animal. Esforços devem ser feitos em todo o território nacional para incentivar a participação dos profissionais médicos veterinários na coleta dessas amostras (APHIS, 2006a);
- d) Não podem existir localidades que não consigam submeter material fresco para um laboratório de saúde pública ou de diagnóstico veterinário (APHIS, 2006a).

Os seguintes locais foram selecionados baseando-se na qualidade dos dados coletados, a média de pontos por amostra, e o total de amostras obtidas (APHIS, 2006a). Adicionalmente, esses locais de coleta tem representatividade nacional, e com possibilidade de amostragem. Bovinos que se enquadram nas categorias de vigilância para EEB podem ser amostrados nos seguintes locais:

- 1) A Campo:

Essas amostras poderão ser coletadas por médicos veterinários acreditados, funcionários estaduais ou federais (incluindo técnicos em saúde animal), ou serviços veterinários aprovados para a coleta de animais mortos em propriedades. Dentro da jurisdição do Escritório Oficial do Serviço Veterinário, as amostras podem ser coletadas por outros profissionais, cadastrados no Escritório, que não listados acima, quando não há recursos

ou profissionais disponíveis nessa região. Embora essas amostras tenham um alto custo quando comparadas a outras categorias, elas apresentam os maiores valores dentro da vigilância desde que sejam bem coletadas, e que os dados da história clínica sejam confiáveis, pois são mais importantes do que outras informações do animal (APHIS, 2006a).

2) Laboratórios de Diagnóstico Veterinário: bovinos submetidos à necropsia, ou SNC fresco submetido a diagnóstico auxiliar em laboratórios de diagnóstico veterinário, incluindo aqueles não envolvidos diretamente para o diagnóstico de EEB, devem ser amostrados pelos profissionais do laboratório. Essas amostras normalmente vêm acompanhadas por rica história clínica e, por isso, tem alto valor na vigilância (APHIS, 2006a).

3) Laboratórios de Saúde Pública: Amostras oriundas de animais suspeitos de raiva e que testaram negativos devem ser submetidos ao teste de EEB por profissionais do laboratório. Todas as amostras com essas características podem ser enquadradas na categoria de suspeitos clínicos, ou seja, com um alto valor na vigilância (APHIS, 2006a).

4) Frigoríficos (Inspeção – FSIS): Bovinos acima de 30 meses condenados na inspeção *antemortem*, ou bovinos de qualquer idade condenados pela presença de sinais clínicos nervosos ou suspeitos de raiva, devem ser coletados pelos funcionários do FSIS ou locais de coletas designados fora das instalações (APHIS, 2006a).

5) Instalações contratadas para coletar amostras de animais condenados no exame *antemortem* pela Inspeção: amostras oriundas de animais condenados na inspeção pelo FSIS durante a inspeção *antemortem* pode ser coletadas por pessoal contratado pela empresa, ou outra condição aprovada pelo APHIS. Considerando essa situação, a comunicação seja por códigos de condenação ou sinais clínicos observados deve ser observada e padronizada entre esses funcionários contratados (APHIS, 2006a).

6) Graxarias: buscando representar a categoria de vigilância “encontrados mortos”, e considerando as mais variadas fontes de informações, determinou-se que serão coletadas apenas 5 mil amostras dessa categoria de vigilância por ano nos EUA. Essa cota é aplicada nessa

categoria desde que as amostras contenham uma adequada história clínica que não as permitam ser enquadradas na categoria de suspeito clínico (APHIS, 2006a).

A avaliação das amostras colhidas é monitorada mensalmente. Se houver algum resultado diferente do esperado, a estratégia de amostragem pode ser modificada. Por exemplo, se não está havendo coleta de amostras de suspeitos clínicos, como era o esperado, pode-se focar na coleta de outras categorias ou outros locais de coleta. Da mesma forma, se verificarmos que há muita coleta de animais sem sinais clínicos, pode-se reduzir a intensidade da coleta (APHIS, 2006a).

Essas restrições podem envolver a redução ou mesmo interrupção nas colheitas em propriedades, em clínicas veterinárias ou em feiras e leilões, ou reduzindo ou interrompendo as coletas de animais condenados na inspeção. Entretanto, as amostras de bovinos com sinais clínicos sempre deverão ser coletadas (sem restrição), assim como suspeitos de raiva, considerados de maior risco para a EEB, da mesma forma animais condenados na Inspeção por esses mesmos sinais (APHIS, 2006a).

Os dados das amostras deverão ser coletados usando formulários específicos do Programa: o *USDA BSE Surveillance Submission Form* e o *USDA BSE Surveillance Data Collection Form*, contidos no ANEXO III. Os formulários deverão ser preenchidos pelo responsável pela colheita, podendo ser manualmente ou eletronicamente, dentro do sistema NAHLN. Se não houver como inserir os dados eletronicamente, cópias dos formulários deverão ser enviadas ao USDA via Escritório do Serviço Veterinário ou pelo *Help Desk BSE* (APHIS, 2008).

A via original do *USDA BSE Surveillance Submission Form* deve ser encaminhado junto com a amostra ao laboratório de diagnóstico. Se as amostras não forem acompanhadas pelo formulário de encaminhamento apropriado, com todas as informações necessárias, é responsabilidade do laboratório de diagnóstico entrar em contato com o local de colheita da amostra. Os laboratórios podem informar o AVIC responsável sobre locais onde há reincidência de não conformidades no envio de amostras e formulários, para medidas corretivas (APHIS, 2008).

O *USDA BSE Surveillance Submission Form* deverá estar completamente preenchido, em particular o local de coleta e a data. O *USDA BSE Surveillance Data Collection Form* deve ser preenchido para cada animal coletado. Todos os tipos de identidade presentes no animal devem ser informadas, incluindo número de brinco, marca de vacinações, número (código) de condenação, tatuagem, marca de fogo, microchip, etc. No caso de amostras de bovinos condenados na inspeção *antemortem*, o número da etiqueta “Z” (etiqueta de condenação utilizada pelo FSIS) deve ser informada (APHIS, 2008).

Os dados relevantes dos testes laboratoriais são inseridos no NALHN pelo pessoal do laboratório de diagnóstico. Os resultados podem ser apresentados da seguinte forma:

- não detectado (negativo no ELISA ou IHQ).
- não detectado, sem óbex* (negativo pelo ELISA – embora a amostra aparenta ter o tronco encefálico, não foi possível a identificação do óbex). Não testado (amostra não testada pois o técnico não conseguiu identificar o tronco encefálico). para esses casos, as razões para esses resultados podem se enquadrar numa nas condições: avançado estado de decomposição da amostra, localização anatômica inadequada ou tecido rompido que não permite uma localização anatômica.
- Reação inicial (positivo no primeiro teste de triagem – ELISA).
- Inconclusivo (foi positivo no teste de triagem, e pelo menos obtém um resultado positivo quando o teste de triagem é repetido em duplicata).
- IHQ inconclusiva (amostra com um resultado equivocado na IHQ).
- Positivo – amostras positivas tanto na IHQ ou no WB.

As amostras deverão ser mantidas refrigeradas até o envio ao laboratório. Elas devem ser encaminhadas o mais rápido possível, em no máximo 7 dias após a colheita. As amostras não devem ser congeladas. Uma vez enviada, a amostra deverá chegar ao laboratório em até 24h, para garantir sua integridade (APHIS, 2006a; APHIS, 2008).

A rede de diagnóstico de EEB, do NAHLN, compreende 7 laboratórios credenciados, nos seguintes Estados: Califórnia, Colorado, Geórgia, Texas, Iowa, Washington e Wisconsin, sendo os quatro primeiros localizados dentro

de instituições de ensino superior em medicina veterinária. Nesses laboratórios são realizadas as provas de ELISA, IHQ e WB (APHIS, 2014).

Carcaças de animais negativos são eliminadas seguindo leis federais, estaduais e municipais. Carcaças e miúdos de animais “inconclusivos” ou positivos para EEB: deverão ser encaminhadas a estabelecimentos de processamento que não se destinem a alimentação animal para incineração, ou enterrio a campo, enterrio em aterros, digestão alcalina ou incineração. As graxarias podem refrigerar ou congelar as carcaças, ou sequestrar lotes até o resultado final. Caso o resultado seja positivo, os lotes sequestrados seriam destruídos e indenizados (APHIS, 2006a).

7 DISCUSSÃO

O Brasil tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo a pecuária uma das principais atividades comerciais do país (ABIEC, 2014). Esta atividade deve ser garantida por ações que visem prevenção à entrada de doenças que possam causar prejuízos a saúde do consumidor, ao comércio e à produtividade bovina.

A Encefalopatia Espongiforme Bovina é considerada uma doença de relevância internacional e que afeta as relações comerciais entre os países que comercializam produtos derivados de bovinos (GELDEREN et al., 2003). Em relação a esta doença, é fundamental que as autoridades de defesa sanitária animal disponham de mecanismos que evitem o ingresso do agente e manter níveis sanitários satisfatórios que previnam a sua disseminação, de acordo com normas internacionais publicadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (RODRIGUES, 2011).

Com o implemento da vigilância ativa da EEB na União Europeia, a partir de 2001, novos métodos foram desenvolvidos para o diagnóstico da doença (incluindo testes rápidos e Western blot). A partir disso, vários casos foram diagnosticados em países que até então nunca tinham notificado a EEB e, conseqüentemente, houve a descoberta quase que simultânea de formas atípicas da doença (SEUBERLICH et al., 2010).

Apesar do conhecimento científico já consolidado sobre as formas atípicas da EEB, atualmente elas não são reconhecidas pela OIE. As últimas edições do Código Terrestre, por exemplo, não contemplam medidas de prevenção ou controle que tratem especificamente das EEB atípicas (OIE, 2014). As diretrizes propostas por esta Organização focam na EEB com sua apresentação clássica, apesar de sua ocorrência estar diminuindo a cada ano (FIGURA 8).



- * 2011: 4 casos atípicos (Holanda, Polônia e Suíça)
- * 2012: 6 casos atípicos (Brasil, Espanha, Suíça e Estados Unidos)
- * 2013: 2 casos atípicos (França)
- * 2014: 4 casos atípicos (Brasil, Alemanha e Romênia)
- * 2015: 1 caso atípico (Noruega) (até 31/01/2015)

FIGURA 8 – CASOS DE EEB DIAGNOSTICADOS NO MUNDO, DE 1988 A JANEIRO DE 2015
FUNTE: OIE (2015)

Observa-se que, em 2014, não houve a notificação de casos clássicos de EEB, somente quatro casos atípicos, dentre eles um diagnosticado no Brasil (OIE, 2015). Esta visível queda no número de focos não deve servir de pretexto para o relaxamento das medidas hoje adotadas para o controle da doença nos países, porém há necessidade de revisão destas diretrizes principalmente em relação a vigilância epidemiológica.

Atualmente, a categoria de suspeitos clínicos é a principal e mais importante para a vigilância da EEB, segundo o Código da OIE (OIE, 2014). Consideram-se, ainda, suspeitos clínicos aqueles animais com sintomatologia compatível com os casos clássicos da doença. Porém, em se tratando das formas atípicas, essa demonstração clínica é muito diferenciada (KONOLD et al., 2012).

Com base nos relatos e publicações sobre as EEB atípicas, nota-se que os casos atípicos estão sendo diagnosticados em animais pertencentes às categorias consideradas menos importantes pela OIE, como de animais encontrados mortos (*fallen stock*), caídos, encaminhados ao abate de emergência, ou mesmo ao abate de rotina (KONOLD et al., 2012).

Diante disso, fica evidenciado que as diretrizes propostas pelo Código da OIE deveriam considerar a atual situação epidemiológica da EEB, onde há uma queda abrupta dos casos clássicos e, em contrapartida, o aparecimento dos casos atípicos. Dessa forma, deveria haver um redimensionamento de prioridades e importância para as demais categorias de vigilância.

Um dos mecanismos para alavancar a vigilância nessas subpopulações seria a realização de estudos que melhorassem a pontuação atribuída a essas amostras pela OIE. Segundo a tabela de pontos das amostras para vigilância de animais vigente (TABELA 9), as categorias de abate de rotina, animais encontrados mortos e submetidos ao abate de emergência recebem a pontuação mais baixa (variando entre 0,0 e 1,6 pontos por amostra), enquanto as amostras de suspeitos clínicos variam entre 45 a 750 pontos (OIE, 2014).

Além do redirecionamento para outras subpopulações, é necessário que a pontuação atribuída à faixa etária de 4 a 7 anos de idade seja revista. Isto porque atualmente ela é o estrato mais bem pontuado da tabela, independente da subpopulação amostrada, e sabe-se que as formas atípicas são mais prevalentes em animais idosos (acima de oito anos) (OIE, 2014). Dessa forma, se aumentarmos a importância (pontuação) dos animais mais velhos, conseqüentemente poderemos teremos maior vigilância nesse estrato.

Assim, o aumento da pontuação atribuída a outras subpopulações e de idade mais avançada poderia estimular a investigação e vigilância, aumentando as chances de se detectar casos atípicos da doença.

Os principais países produtores e exportadores de carne bovina são signatários da OIE e balizam seus planos de vigilância para enfermidades de acordo com o Código Terrestre. Assim, a análise de qualquer programa sanitário deve levar em consideração as recomendações desta Organização. Considerando as EEB atípicas, doença na qual a OIE não fornece subsídios para fomentar programas visando sua detecção, qualquer crítica decorrente dessa análise fica comprometida.

O grande diferencial na detecção dos casos atípicos está na análise laboratorial que permite a diferenciação do agente causal (BIACABE et al., 2008). Em relação ao diagnóstico da EEB, o capítulo 2.4.6 do Manual de

Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2010) permite que os países escolham os métodos a serem utilizados, porém recomenda o uso de dois métodos consecutivos para a confirmação de casos de EEB.

Nas EEB atípicas, apenas o exame de Western blot é capaz de diferenciá-las da forma clássica, que, por sua vez, necessita de amostras frescas (não formolizadas) para ser realizado (SEUBERLICH et al., 2010). Considerando que em muitos países as amostras de SNC oriundas da vigilância das EET são acondicionadas somente em formol (como no Brasil), seria importante a OIE estimulasse a utilização do WB em detrimento a outras técnicas de diagnóstico baseadas na histologia. Dessa forma, haveria maior possibilidade de diagnóstico das formas atípicas em todo o mundo.

É necessário que os programas de vigilância de EEB tenham a capacidade de diagnosticar, por si mesmos, todas as formas da doença (SEUBERLICH et al., 2010). Nesse intuito, faz-se necessário dispor de um corpo laboratorial reconhecidamente competente para a realização das análises de WB, além de se ter a coleta de material encefálico fresco para viabilizar essa diferenciação.

Quando se compara o Sistema de Vigilância da EEB do Brasil e dos Estados Unidos, é interessante fazê-lo por partes, contemplando assim todos os pilares comuns de ambos os sistemas que são: a) controle de importação de bovinos vivos e seus subprodutos; b) proibição da utilização de proteína animal na alimentação de ruminantes (*feed ban*); c) controle e tratamento de subprodutos de origem animal; d) controle nos estabelecimentos de produção de alimentos para ruminantes e; e) remoção e destruição de materiais de risco específico (MRE) para a EEB.

Em relação ao controle e importação de bovinos vivos e seus subprodutos, a TABELA 12 expõe as medidas adotadas Sistema Brasileiro e dos EUA, cronologicamente. Observa-se que ambos iniciaram as restrições de importação de países que notificaram a doença no início da década de 90: em 1989 nos Estados Unidos (USDA, 1989) e em 1990 no Brasil (BRASIL, 1990). Vale ressaltar que, no Brasil, ainda há bovinos importados originários da Europa e de outros países que notificaram casos de EEB, sendo proibido o abate destes. Nesse caso, há uma normativa que determina o

monitoramento periódico destes animais, e prevê indenização aos seus proprietários (quando do fim da vida produtiva dos bovinos) (BRASIL, 2003a).

| Medidas de Controle de Importação de Bovinos Vivos e seus subprodutos | |
|---|---|
| Sistema do Brasil | Sistema dos EUA |
| Primeira medida de controle de importação de bovinos vivos: 1990 (BRASIL, 1990) | Primeira medida de controle de importação de bovinos vivos: 1989 (USDA, 1989) |
| Proibição do abate de bovinos importados, indenização do proprietário e monitoramento periódico (BRASIL, 2003a) | |

TABELA 12 – MEDIDAS DE CONTROLE DE IMPORTAÇÃO DE BOVINOS VIVOS E SEUS SUBPRODUTOS ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB

Em relação a proibição da utilização de subprodutos de origem animal na alimentação de ruminantes (*feed ban*), a TABELA 13 mostra as medidas adotadas Sistema Brasileiro e dos EUA. No Brasil, as primeiras medidas para controle da alimentação de ruminantes foram iniciadas em 1996, primeiramente proibindo proteínas de ruminantes (BRASIL, 1996) para depois, em 2004, proibir proteínas e subprodutos de origem animal (com exceção a produtos lácteos e outros produtos) (BRASIL, 2004). Nos Estados Unidos, o *feed ban* teve início em 1997, e só inclui na proibição proteínas e subprodutos de mamíferos (FDA, 1997). Além disso, há permissão para o processamento e utilização de carcaças de animais mortos encontrados em propriedades para a fabricação de alimentos para não ruminantes (USDA, 2011), prática que não está prevista na legislação brasileira.

Com relação às fiscalizações para a garantia do *feed ban*, no Brasil são realizados dois tipos de fiscalização: uma na fábrica de alimentos para ruminantes (BRASIL, 2003c; BRASIL, 2007c; BRASIL, 2007d), e outra diretamente na propriedade rural, onde o pecuarista manipula as rações (BRASIL, 2004; BRASIL, 2009; BRASIL, 2011). Em relação à fábrica de alimentos, a legislação brasileira proíbe a produção, numa mesma planta, de alimentos para ruminantes e não ruminantes (visando coibir a contaminação cruzada) (BRASIL, 2008c). Nos Estados Unidos, há somente a fiscalização nas fábricas (FDA, 1997), e há respaldo para que haja a produção de alimentos para ruminantes e não ruminantes na mesma planta, desde que

haja limpeza e desinfecção da linha entre os processamentos (FDA, 2003a; FDA, 2003b).

| Medidas de Controle da Alimentação de Ruminantes (<i>Feed ban</i>) | |
|---|--|
| Sistema do Brasil | Sistema dos EUA |
| Primeira medida de controle da alimentação de ruminantes: 1996 (BRASIL, 1996) | Primeira medida de controle da alimentação de ruminantes: 1997 (FDA, 1997) |
| Proibição da utilização de proteínas animais (BRASIL, 2004) | Proibição da utilização de proteínas de mamíferos (FDA, 1997) |
| Fiscalização na fábrica de rações (BRASIL, 2003c) e em propriedades rurais (BRASIL, 2004) | Fiscalização em fábricas de rações (FDA, 1997) |
| Proibição da produção, na mesma planta, de alimentos para ruminantes e não ruminantes (BRASIL, 2008c) | Permite a produção, na mesma planta, de alimentos para ruminantes e não ruminante, com limpeza e desinfecção da linha (FDA, 2003a,b) |

TABELA 13 – MEDIDAS DE CONTROLE DA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES (FEED BAN) ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB

Vale salientar que a fiscalização realizada a campo, pelas autoridades brasileiras, é bastante rígida e prevê, caso seja comprovada a utilização de subprodutos de origem animal proibidos, o abate de todos os bovinos expostos a este alimento (BRASIL, 2009).

No Brasil, o controle realizado nas graxarias e processadoras de subprodutos de origem animal segue rigorosamente o preconizado pela OIE, ou seja: as partículas não podem ter tamanho superior a 50mm, deverão ser submetidas a tratamento térmico em atmosfera saturada que atinja a temperatura de 133°C, por no mínimo 20 minutos, à 3bar de pressão absoluta (BRASIL, 2008b; OIE, 2014).

Nos Estados Unidos, parâmetros para o processamento dos materiais nas graxarias não são limitados, porém todos os protocolos de controle baseiam-se em estudos científicos sobre a redução da infectividade do prion nesses estabelecimentos (TAYLOR et al., 1995b; COHEN et al., 2006). Outro fator importante e que difere da realidade brasileira, é que as graxarias independentes podem receber animais encontrados mortos em propriedades rurais, ou miudezas oriundas de abates em pequena escala (USDA, 2011). A TABELA 14 sintetiza as medidas de controle e tratamento de subprodutos de origem animal adotadas Sistema Brasileiro e dos EUA.

| Medidas de Controle e Tratamento de Subprodutos de Origem Animal | |
|---|--|
| Sistema do Brasil | Sistema dos EUA |
| Segue os parâmetros preconizados pela OIE: Temperatura de 133°C por 20 minutos a 3 bar de pressão (BRASIL, 2008b) | Não há parâmetros Os procedimentos baseiam-se em estudos científicos (TAYLOR et al., 1995b) As graxarias recebem animais encontrados mortos (USDA, 2011) |

TABELA 14 - MEDIDAS DE CONTROLE E TRATAMENTO DE SUBPRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB

Em relação a remoção e destruição do MRE, como medida para proteger a saúde humana e evitar a reciclagem do agente, existem certas características a serem discutidas no sistema de vigilância brasileiro. As medidas propostas pelo MAPA em relação a esse assunto seguem normativas internacionais e estão, de certa forma, alinhadas com o sistema dos EUA. Porém, o fato das normas relativas a esse tema serem quase que exclusivamente aplicadas à estabelecimentos sob Inspeção Federal (BRASIL, 2007b) compromete profundamente o objetivo maior desta medida, que é proteger a saúde humana e evitar a reciclagem do agente.

Isso porque, de modo geral, as condições sanitárias dos animais abatidos nos abatedouros sob inspeção estadual e municipal são inferiores aos dos abatidos sob inspeção federal (PICCHI, 1998), e onde frequentemente são abatidos animais de aptidão leiteira no final de sua vida produtiva (animais idosos), categoria de alta especificidade relativa a EEB clássica (PRINCE et al., 2003), e também para as EEB atípicas. A falta de previsão legal que determine a remoção e destruição do MRE e a colheita de troncos encefálicos de animais encaminhados ao abate de emergência (BRASIL, 2010) nestes estabelecimentos enfraquece essa ação como medida de mitigação de risco e vigilância para a EEB no país.

Em relação as formas atípicas, que sabidamente tem maior prevalência em bovinos mais velhos, o fato destes serviços de inspeção, em sua grande maioria, não realizarem estas ações implica no risco de termos subnotificações de casos positivos, permitindo que o MRE de animais idosos, potencialmente positivos para as formas atípicas de EEB, adentrem na cadeia alimentar humana e animal. Dessa forma, caso se comprove a

transmissão das formas atípicas de EEB aos ruminantes por via oral, ou que seja comprovado seu caráter zoonótico, tem-se o risco de se ter o surgimento de novos casos da doença no país, como também de casos humanos, acarretando em perdas enormes de ordem econômica e Saúde Pública (SEUBERLICH et al., 2010).

Visando proteger seus consumidores, o USDA proibiu a utilização animais encaminhados ao abate de emergência e a carne mecanicamente separada (CMS) de bovinos para o consumo humano (FSIS, 2004a; FSIS, 2011). Até o presente momento, não há qualquer normativa brasileira que proíba o encaminhamento dessa categoria animal para a alimentação humana, salvo quando há outras enfermidades envolvidas.

Em relação aos tecidos considerados de risco para a EEB, a lista de materiais determinada pelo USDA é mais ampla do que a brasileira, e inclui: o gânglio trigêmeo, a coluna vertebral (excluindo as vértebras da cauda, o processo transversal das vértebras torácicas e lombares, e as asas do sacro), e o gânglio da raiz dorsal (FSIS, 2007). A infectividade para o agente da EEB já foi comprovada cientificamente em todos estes materiais, sendo extremamente importante que a legislação brasileira os incluísse na lista de MRE. A relação das medidas para a prevenção da EEB adotadas em estabelecimentos de abate de ruminantes nos dois países pode ser observada na TABELA 15.

| Medidas de Controle em Estabelecimentos de Abate de Ruminantes | |
|--|---|
| Sistema do Brasil | Sistema dos EUA |
| Não proíbe o consumo de bovinos submetidos ao abate de emergência e de CMS | Proíbe o consumo bovinos submetidos ao abate de emergência (FSIS, 2004a) e CMS (FSIS, 2011) |
| MRE- Não incluem o gânglio trigêmio, a coluna vertebral e o gânglio da raiz dorsal (BRASIL, 2007b) | MRE- incluem o gânglio trigêmio, a coluna vertebral e o gânglio da raiz dorsal (FSIS, 2007) |
| Medidas adotadas principalmente em SIF | Medidas adotadas em todos os estabelecimentos de abate |

TABELA 15 - MEDIDAS DE CONTROLE EM ESTABELECEMENTOS DE ABATE DE RUMINANTES ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB

Quanto a vigilância da EEB em relação às populações amostradas e técnicas laboratoriais, alguns pontos devem ser salientados quando se

compara o sistema brasileiro com o dos EUA. A TABELA 16 permite a comparação entre as medidas de vigilância epidemiológica da EEB entre os dois sistemas avaliados. Em relação às categorias de vigilância, ambos os sistemas seguem o preconizado pela OIE (OIE, 2014). Pelo fato de existir estabelecimentos que recolhem e processam animais mortos nos EUA, há vigilância, limitada a cinco mil amostras, em bovinos encaminhados a estes locais (APHIS, 2006a). Em contrapartida, o sistema de vigilância brasileiro prevê colheita e testes para a EEB em todos os bovinos importados de países que notificaram a doença (categoria não preconizada pela OIE) (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2014).

Em relação às técnicas laboratoriais, o Brasil padronizou somente as técnicas de histopatologia e imunohistoquímica (BRASIL, 2002b; BRASIL, 2007a). A ausência de padronização da técnica de Western Blot (WB) limita o diagnóstico das formas atípicas de EEB (e mantém uma dependência internacional para esse procedimento laboratorial). Além disso, os materiais de colheita para a vigilância desta enfermidade são acondicionados exclusivamente em formol (BARROS et al., 2003), o que inviabiliza a realização, de rotina, da referida técnica.

Nos EUA, o WB e testes rápidos são análises de rotina na vigilância da EEB, sendo que as amostras de campo são encaminhadas somente sob refrigeração aos laboratórios (APHIS, 2006a; APHIS, 2008). Além disso, neste país há sete laboratórios credenciados para a realização de diagnósticos de EEB, sendo que quatro estão ligados a Universidades, e bem distribuídos geograficamente, o que viabiliza o encaminhamento de amostras frescas do campo (APHIS, 2014). No Brasil, tem-se apenas um laboratório que realiza para a técnica de IHQ, localizado na região nordeste do país (MAPA, 2014). Assim, somando-se as limitações logísticas para o transporte rápido das amostras no país, e a pouca abrangência geográfica dos laboratórios de diagnóstico, a utilização da refrigeração como forma de acondicionamento das amostras fica prejudicada. Para viabilizar a utilização de técnicas que necessitem de amostras frescas, como o WB e testes rápidos, seria necessário ampliar a capilaridade da rede laboratorial brasileira e reforçar a logística para transporte desse material.

| Medidas de Vigilância Epidemiológica da EEB | |
|--|---|
| Sistema do Brasil | Sistema dos EUA |
| Categoria bovinos importados (BRASIL, 2003a) | Categoria bovinos encontrados mortos e encaminhados a graxaria (APHIS, 2006a) |
| Técnicas laboratoriais: Histopatologia (BRASIL, 2002b) IHQ (BRASIL, 2007a) | Técnicas laboratoriais: ELISA/ IHQ WB |
| Somente amostras fixadas em formol (BARROS et al., 2003) | Somente amostras frescas (APHIS, 2006a) (APHIS, 2008) |
| Apenas um laboratório de diagnóstico das EET (LANAGRO-PE) (MAPA, 2014) | Sete laboratórios de diagnóstico das EET (APHIS, 2014) |

TABELA 16 - MEDIDAS DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA EEB ADOTADAS PELO SISTEMA BRASILEIRO E ESTADUNIDENSE DE VIGILÂNCIA DA EEB

A participação dos médicos veterinários privados na execução dos programas de sanidade animal é muito expressiva nos EUA. Quase 80% desses profissionais foram treinados pelos programas de acreditação promovidos pelo USDA. Essa participação em massa demonstra o interesse e o conhecimento do corpo veterinário sobre a importância da sanidade animal (USDA, 2010).

No Brasil, há pouca participação destes profissionais na área de defesa sanitária animal, menos de 7% do total de médicos veterinários atuantes no país são credenciados para realizar ações de vigilância da EEB (DSA, 2014a; DSA, 2014c; CFMV, 2013), sendo uma atribuição quase que exclusiva dos médicos veterinários oficiais. Esta característica impacta principalmente nos custos ao governo, pois há necessidade da contratação de médicos veterinários oficiais para que haja capilaridade suficiente que garanta a execução das ações de defesa sanitária animal em todo o território nacional. Quando se tem profissionais do setor privado sensibilizados sobre os temas de sanidade animal, ações como a notificação de enfermidades de controle e até colheita de amostras podem ser compartilhadas entre o serviço particular e oficial, melhorando o sistema de vigilância como um todo.

7 CONCLUSÃO

Em relação às diretrizes da OIE para sistemas de vigilância da EEB, pode-se concluir que os sistemas dos EUA e do Brasil estão de acordo com o que é preconizado por esta Organização. Porém, cabe ressaltar que esta mesma Organização não prevê ações pertinentes ao controle e prevenção das EEB atípicas, dessa forma foi necessário aprofundar a análise em todos os pontos relativos ao sistema de vigilância, incluindo, por exemplo, as medidas de mitigação de risco.

Primeiramente, é necessário que a Organização Mundial de Saúde Animal adeque suas diretrizes de vigilância para estimular os países membros na detecção de casos atípicos de EEB. Essa adequação poderia se iniciar pela priorização de amostras oriundas de outras categorias para a EEB (que não a de suspeito clínico) e de animais mais idosos, mediante a alteração da pontuação atribuída a cada amostra coletada.

Em relação ao sistema de vigilância brasileiro, pode-se concluir que há necessidade de alterações profundas no sistema de acondicionamento de amostras e exames laboratoriais, pois o atual sistema está voltado para o diagnóstico da forma clássica da EEB (histopatologia e imunohistoquímica). Primeiramente é necessário que as técnicas de Western blot sejam validadas e implantadas nos laboratórios e, concomitantemente, que haja mudança no acondicionamento das amostras oriundas da vigilância da EEB (amostras refrigeradas).

As medidas de mitigação de risco, principalmente aquelas atinentes à remoção e destruição do material de risco específico, devem ser analisadas com atenção. O fato dessas medidas não atingirem todos os estabelecimentos de abate, como ocorre nos Estados Unidos, traz grande preocupação, o que se soma ao fato de pouco se saber sobre a distribuição do agente das formas atípicas da EEB nas carcaças bovinas.

Além disso, há três materiais que comprovadamente apresentam infectividade para o agente da EEB que não estão contemplados na lista de MRE do Brasil. Considerando que pouco se sabe sobre a distribuição e infectividade do agente das formas atípicas de EEB nos bovinos, pode-se concluir que a remoção e destruição do MRE é a principal medida para evitar

que haja a reciclagem do agente, e de proteção aos consumidores e, nessa linha, é necessária a inclusão imediata desses materiais nessa lista.

Conclui-se que o sistema de vigilância da EEB no Brasil é mais voltado para a saúde animal, em relação ao sistema estadunidense. Essa conclusão se deve ao fato das normas sobre medidas de mitigação de risco voltada a saúde dos animais, neste país, serem menos rígidas que as implantadas no Brasil.

Ambos os sistemas podem ser considerados eficientes, porém as adequações apontadas nesse trabalho são necessárias para que sistema do Brasil atinja um grau de excelência e que forneça mais garantia aos consumidores dos produtos cárneos brasileiros.

9 REFERÊNCIAS

ALPER, T.; HAIG, D.A.; CLARKE, M.C. The exceptionally small size of the scrapie agent. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v. 22, p. 278-284, 1966.

ANDERSON, R.M.; DONNELLY, C.A.; FERGUSON, N.M.; WOOLHOUSE, M.E.; WATT, C.J.; UDY, H.J.; MAWHINNEY, S.; DUNSTAN, S.P.; SOUTHWOOD, T.R.; WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.; HOINVILLE, L.J.; HILLERTON, J.E.; AUSTIN, A.R.; WELLS, G.A. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. **Nature**, v. 382, p. 779-788, 1996.

ANDREOLETTI, O.; SIMON, S.; LACROUX, C.; MOREL, N.; TABOURET, G.; CHABERT, A.; LUGAN, S.; CORBIERE, F.; FERRE, P.; FOUCRAS, G.; LAUDE, H.; EYCHENNE, F.; GRASSI, J.; SCHELCHER, F. PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. **Nature Medicine**, V.10, P. 591-593, 2004.

ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS). Bovine Spongiform Encephalopathy Ongoing Surveillance Plan, 2006a.

Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/bse/downloads/BSE_ongoing_surv_plan_final_71406.pdf>. Acesso em: 25/12/2014.

ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS). Memo VS 580.16, 2006b. Disponível em:

<https://www.fbo.gov/?s=opportunity&mode=form&id=54171a563c2c6d9295f31788d804809d&tab=core&tabmode=list&print_preview=1>.

Acesso em 25/12/2014.

ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS). **Procedures Manual: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Ongoing Surveillance Program**. 8 de outubro de 2008. Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/lab_info_services/downloads/BSE_Procedures_Manual.pdf>. Acesso em: 20/12/2014.

ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS). BSE NAHLN Laboratories. 2014. Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahln/downloads/bse_lab_list.pdf> Acesso em: 25/1/2014.

ARNOLD, M.E.; WILESMITH, J.W. Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 66, p. 35-47, 2004.

ARNOLD, M.E.; RYAN, J.B.M.; KONOLD, T.; SIMMONS, M.M.; SPENCER, Y.I.; WEAR, A.; CHAPLIN, M.; STACK, M.; CZUB, S.; MUELLER, R.; WEBB, P.R.; DAVIS, A.; SPIROPOULUS, J.; HOLDAWAY, J.; HAWKINS, S.A.C.; AUSTIN, A.R.; WELLS, G.A.H. Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform

encephalopathy of cattle. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 3198-3208, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). Rebanho Brasileiro - 2014. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp> Acesso em: 20/11/2014.

AUSTIN, A.R.; SIMMONS, M.M. Reduced rumination in Bovine Spongiform Encephalopathy and scrapie. **Veterinary Record**, v. 132, p. 324-325, 1993.

AUSTIN, A.R.; SIMMONS, M.M.; WELLS, G.A.H. Pathological temperamento changes in bovines. **Irish Veterinary Journal**, v. 50, p. 304-307, 1997a.

AUSTIN, A.R.; PAWSON, L.; MEEK, S.; WEBSTER, S. Abnormalities of heart rate and rhythm in bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v. 141, p. 352-357, 1997b.

AUSTIN, A.R. The clinical manifestations of bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Atti della Società Italiana di Buiatria**, v. 32, p. 3-6, 2000.

BALKEMA-BUSCHMANN, A.; FAST, C.; KAATZ, M.; EIDEN, M.; ZIEGLER, U.; MCINTYRE, L.; KELLER, M.; HILLS, B.; GROSCHUP, M.H. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 112-117, 2011a.

BALKEMA-BUSCHMANN, A.; ZIEGLER, U.; MCINTYRE, L.; KELLER, M.; HOFFMANN, C.; ROGERS, R.; HILLS, B.; GROSCHUP, M.H. Experimental challenge of cattle with german atypical BSE isolates. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 74, p. 103-109, 2011b.

BARON, T.; CROZET, C.; BIACABE, A.G.; PHILIPPE, S.; VERCHERE, J.; BENCSIK, A.; MADEC, J.Y.; CALAVAS, D.; SAMARUT, J. Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. **Journal of Virology**, v. 78, p. 6243-6251, 2004.

BARON, T.G.M.; BIACABE, A.G.; BENCSIK, A.; LANGEVELD, P.M. Transmission of new bovine prion to mice. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1125-1128, 2006.

BARON, T.; BIACABE, A.G.; ARSAC, J.N.; BENESTAD, S.; GROSCHUP, M.H. Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. **Vaccine**, v. 25, p. 5625-5630, 2007a.

BARON, T.; BENCSIK, A.; BIACABE, A.G.; MORIGNAT, E.; BESSEN, R.A. Phenotypic similarity of transmissible mink encephalopathy in cattle and I-type bovine spongiform encephalopathy in a mouse model. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1887-1894, 2007b.

BARON, T.; VULIN, J.; BIACABE, A.G.; LAKHDAR, L.; VERCHERE, J.; TORRES, J.M.; BENCSIK, A. Emergence of classical BSE strain properties during serial passages of H-BSE in wild type mice. **PLoS ONE**, [online] v. 6 e15839, 2011.

BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003.

BATEMAN, D.; HILTON, D.; LOVE, S.; ZEIDLER, M.; BECK, J.; COLLINGE, J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-years-old in the UK. **Lancet**, v. 346, p. 1155-1156, 1995.

BELAY, E.D. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 283-314, 1999.

BELAY, E.; SCHONBERGER, L. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease and Bovine Spongiform Encephalopathy. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, p. 849-862, 2002.

BENESTAD, S.L.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHONHEIT, J.; TRANULIS, M.A.; BRATBERG, B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type. **Veterinary Record**, v. 153, p. 202-208, 2003.

BERG, L.J. Insights into the role of the immune system in prion diseases. **Proceedures of National Academy of Science of United States of America**, v. 91, p. 429-432, 1994.

BÉRINGUE, V.; BENCSIK, A.; LE DUR, A.; REINE, F.; LAÏ, T.L.; CHENAIS, N.; TILLY, G.; BIACABE, A.G.; BARON, T.; VILOTTE, J.L.; LAUDE, H. Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. **PLoS Pathogens**, [online] 2:e112, 2006.

BÉRINGUE, V.; ANDRÉOLETTI, O.; LeDUR, A.; ESSALMANI, R.; VILOTTE, J.L.; LACROUX, C.; REINE, F.; HERZOG, L.; BIACABE, A.G.; BARON, T.; CARAMELLI, M. CASALONE, C.; LAUDE, H. A Bovine Prion acquires an Epidemic Bovine Spongiform Encephalopathy Strain-Like phenotype on Interspecies Transmission. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 6965-6971, 2007.

BÉRINGUE, V.; HERZOG, L.; REINE, F.; LE DUR, A.; CASALONE, C.; VILOTTE, J.L.; LAUDE, H. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1898-1901, 2008.

BESSEN, R.A.; MARSH, R.F. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7859-7868, 1994.

BIACABE, A.G.; LAPLANCHE, J.L.; RYDER, S.; BARON, T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. **EMBO Rep**, v. 5, n. 1, p. 110-

115, 2004.

BIACABE, A.G.; MORIGNAT, E.; VULIN, J.; CALAVAS, D.; BARON, T. Atypical Bovine Spongiform Encephalopathies, France, 2001-2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 298-300, 2008.

BIRD, S.M. European Union's rapid TSE testing in adult cattle and sheep: implementation and results in 2001 and 2002. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 12, p. 261-278, 2003.

BOSQUE, P.J.; RYOU, C.; TELLING, G.; PERETZ, D.; LEGNAME, G.; DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. Prions in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3812-3817, 2002.

BRADLEY, R. Embryo transfer and its potential role in control of scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Livestock Production Science**, v. 38, p. 51-59, 1994.

BRANDNER, S.; ISENMANN, S.; RAEBER, A.; FISCHER, M.; SAILER, A.; KOBAYASHI, Y.; WEISSMANN, C.; AGUZZI, A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. **Nature**, v. 379, p. 339-343, 1996.

BRASIL. Decreto n. 24.548, de 3 de julho de 1934. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Rio de Janeiro, RJ, 14 jul. 1934. Seção 1, p. 4.

BRASIL. Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 dez. 1974. Seção 1, p. 15013.

BRASIL. Instrução de Serviço n. 01, de 31 de julho de 1990. Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n.2, de 01 de julho de 1991. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jul. 1991. Seção 1, p. 14156.

BRASIL. Instrução Normativa n. 1, de 24 de novembro de 1992. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 dez. 1992. Seção 1, p. 17742.

BRASIL. Instrução Normativa n. 2, de 08 de setembro de 1993. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 set. 1993. Seção 1, p. 13646.

BRASIL. Portaria n. 365, de 03 de julho de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 jul. 1996. Seção 1, p. 12290.

BRASIL. Portaria n. 516, de 09 de dezembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 dez. 1997. Seção 1, p. 29476.

BRASIL. Instrução Normativa n. 18, de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 fev.2002(a). Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa n. 15, de 15 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 mar. 2002(b). Seção 1, p. 5.

BRASIL. Portaria SDA n. 14, de 15 de março de 2002(c). Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n. 18, de 15 de dezembro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 dez. 2003(a). Seção 1, p. 21.

BRASIL. Instrução de Serviço Conjunta DDA/DIPOA nº 02 de 15 de agosto de 2003(b). Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n. 69, de 23 de setembro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 set. 2003(c). Seção 1, p. 8.

BRASIL. Instrução Normativa n. 08, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 mar. 2004. Seção 1, p. 5.

BRASIL. Memorando Circular CGI/DIPOA n. 02, de 07 de abril de 2005. Brasília, DF.

BRASIL. Decreto n. 5741, de 30 de março de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 mar. 2006(a). Seção 1, p. 82.

BRASIL. Instrução Normativa n. 30 de 07 de junho de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jun. 2006(b). Seção 1, p.5.

BRASIL. Instrução Normativa n. 36, de 05 de outubro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 out. 2007(a). Seção 1, p. 5.

BRASIL. Memorando Circular CGI/DIPOA n. 1, de 23 de janeiro de 2007(b). Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n. 04 de 23 de fevereiro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 fev.2007(c).Seção 1, p. 15.

BRASIL. Decreto n. 6926 de 11 de dezembro de 2007. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 dez. 2007(d). Seção 1, p. 08.

BRASIL. Instrução Normativa n. 49, de 15 de setembro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 set.2008(a). Seção 1, p. 8.

BRASIL. Instrução Normativa n. 34, de 28 de maio de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 mai. 2008(b). Seção 1, p. 13.

BRASIL. Instrução Normativa n. 17, de 7 de abril de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 abr.2008(c). Seção 1, p. 12.

BRASIL. Instrução Normativa n. 41 de 08 de outubro de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 out.2009. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Memorando CGI/DIPOA n. 124/2010, de 17 de agosto de 2010. Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n. 42 de 30 de agosto de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 ago.2011. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Memorando Circular n. 73 de 18 de dezembro de 2012. Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa n. 44, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2013(a). Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual do Sistema Nacional de Informação Zoossanitária - SIZ / Ministério da Agricultura. Brasília: MAPA/ACS, 2013(b). 2ªed. 40 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual%20SIZ/Manual_SIZ_09_12_2013.pdf>. Acesso em: 29/01/2015.

BRASIL. Instrução Normativa n. 13, de 14 de maio de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 mai.2014. Seção 1, p. 10.

BRAUN, U. KIHM, U.; PUSTERLA, N.; SCHONMANN, M. Clinical Examination upon suspicion of bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 139, p. 35-41, 1997.

BRAUN, U.; PUSTERLA, N.; SCHICKER, E. Bovine Spongiform Encephalopathy: diagnostic approach and clinical findings. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.10, p. 270-278, 1998a.

BRAUN, U.; SCHICKER, E.; HORNLIMANN, B. Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v. 143, p. 101-105, 1998b.

BRAUN, U.; AMREIN, E.; ESTERMANN, U.; PUSTERLA, N.; SCHONMANN, M.; SCHWEIZER, T.; EHRENSPERGER, F.; VANDEVELDE, M.; KIHM, U. Reliability of a diagnosis of BSE made on the basis of clinical signs. **Veterinary Record**, v. 145, p. 198-200, 1999.

BRITTON, T.C.; AL-SARRAJ, S.; SHAW, C.; CAMPBELL, T.; COLLINGE, J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-years-old in the UK. **Lancet**, v. 346, p. 1155, 1995.

BROWN, P. The clinical epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in the context of bovine spongiform encephalopathy. In: Bradley, R.; Savey, M.; Marchant, B. Ed. **Sub-acute spongiform encephalopathies**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 195-202, 1991.

BROWN, P.; WILL, R.G.; BRADLEY, R.; ASHER, D.M.; DETWILER, L. Bovine Spongiform Encephalopathy and variant of Creutzfeldt-Jakob Disease: background, evolution, and current concerns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 6-16, 2001.

BROWN, P.; BRADLEY, R.; DETWILER, L.; DORMONT, D.; HUNTER, N.; WELLS, G.A.H. Transmissible spongiform encephalopathy as a zoonotic disease. **International Life Sciences Institute (ILSI) Press**, 2003.

BROWN, P.; MCSHANE, L.M.; ZANUSSO, G.; DETWILER, L. On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1816-1821, 2006.

BRUCE, M.E.; WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; MCCONNELL, I.; DRUMMOND, D.; SUTTIE, A.; MCCARDLE, L.; CHREE, A.; HOPE, J.; BIRKETT, C.; COUSENS, S.; FRASER, H.; BOSTOCK, C.J. Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by BSE agent. **Nature**, v. 389, p. 498-501, 1997.

BRUNELLE, B.W.; HAMIR, A.N.; BARON, T.; BIACABE, A.G.; RICHT, J.A.; KUNKLE, R.A.; CUTLIP, R.C.; MILLER, J.M.; NICHOLSON, E.M. Polymorphisms of the prion gene promoter region that influence classical bovine spongiform encephalopathy susceptibility are not applicable to other transmissible spongiform encephalopathies in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 12, p. 3142-3147, 2007

BUELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.L.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, p. 339-343, 1993.

BURGER, D.; HARTSOUGH, G.R. Encephalopathy of mink II: experimental

and natural transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 115, p. 393-399, 1965.

BUSCHMANN, A.; GROSCHUP, M.H. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 934-942, 2005.

BUSCHMANN, A.; GRETZSCHEL, A.; BIACABE, A.G.; SCHIEBEL, K.; CORONA, C.; HOFFMANN, C.; EIDEN, M.; BARON, T.; CASALONE, C.; GROSCHUP, M.H. Atypical BSE in German – Proof of transmissibility and biochemical characterization. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 103-116, 2006.

CAPOBIANCO, R.; CASALONE, C.; SUARDI, S.; MANGIERI, M.; MICCOLO, C.; LIMIDO, L.; CATANIA, M.; ROSSI, G.; DI FEDE, G.; GIACONNE, G.; BRUZZONE, M.G.; MINATI, L.; CORONA, C.; ACUTIS, P.; GELMETTI, D.; LOMBARDI, G.; GROSCHUP, M.H.; BUSCHMANN, A.; ZANUSSO, G.; MONACO, S.; CARAMELLI, M. TAGLIAVINI, F. Conversion of the BASE prion protein into the BSE strain: the origin of BSE? **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 0001-0008, 2007.

CASALONE, C. ; ZANUSSO, G.; ACUTIS, P.; FERRARI, S.; CAPUCCI, L.; TAGLIAVINI, F.; MONACO, S.; CARAMELLI, M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 3065-3070, 2004.

CASTELEYN, C.; BREUGELMANN, S.; MUYLLE, S.; VAN DEN BROECK, W.; SIMOENS, P. Consumption of bovine tongue and thymus: a risk to public health? **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 76, p. 130-137, 2007.

CASTELLANI, R.; PARCHI, P.; STAHL, J.; CAPELLARI, S.; COHEN, M.; GAMBETTI, P. Early pathologic and biochemical changes in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology**, v. 46, n. 6, p. 1690-1693, 1996.

CHAPLIN, M.J.; BARLOW, N.; RYDER, S.; SIMMONS, M.M.; SPENCER, Y.; HUGHES, R.; STACK, M.J. Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrP^{Sc} by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE. **Research in Veterinary Science**, v.72, p. 37-43, 2002.

CHELLE, P.L. Un cas de tremblante chez la Chèvre [a case of scrapie in a goat]. **Bulletin du Academie Veterinaire Française**, v. 15, p. 294-295, 1942.

CISSE, M.; MUCKE, L. Alzheimer's disease: a prion protein connection. **Nature**, v. 457, p. 1090-1091, 2009.

CLAWSON, M.L.; RICHT, J.A., BARON, T.; BIACABE, A.G.; CZUB, S.; HEATON, M.P.; SMITH, T.P.L. LAEGREID, W.W. Association of a bovine prion gene haplotype with atypical BSE. **PLOS ONE**, [online] 3:e1830, 2008.

CODA/CEVA. LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM EET NA BÉLGICA. Disponível em:

<<http://www.aulavirtual.senasa.gov.ar/cursos/multimedia/eeb/html/biblio/doc/Bosschere2.pdf>>. Acesso em: 20/10/2014.

COHEN, J.T.; DUGGAR, K.; GRAY, G.M.; KREINDEL, S.; ABDELRAHMAN, H.; HABTEMARIAM, T.; ORYANG, D; TAMERU, B. Evaluation of the potential for bovine spongiform encephalopathy in the United States. Harvard Center for Risk Analysis, Harvard School of Public Health; and Center for Computational Epidemiology, College of Veterinary Medicine, Tuskegee University, 2001. Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/lpa/issues/bse/risk_assessment/mainreporttext.pdf>. Acessado em: 15/01/2015.

COLCHESTER, A.C.F.; COLCHESTER, N.T.H. The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. **Lancet**, v. 366, p. 856-861, 2005.

COLLEE, J.G.; BRADLEY, R. BSE: a decade on – part I. **Lancet**, v. 349, p. 636-664, 1997.

COLLINGE, J.; SIDLE, K.C.L.; MEADS, J.; IRONSIDE, J.; HILL, A.F. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. **Nature**, v. 383, p. 685-690, 1996.

COMOY, E.E.; CASALONE, C.; ETCHEGARAY, N.L.; ZANUSSO, G.; FREIRE, S.; MARCE, D.; AUVRE, F.; RUCHOUX, M.M.; FERRARI, S.; MONACO, S.; SALES, N.; CARAMELLI, M.; LEBOULCH, P.; BROWN, P.; LASMÉZAS, C.I.; DESLYS, J.P. Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. **PLoS ONE**, [online] 3:e3017, 2008.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). O Brasil é recordista. Assessoria de Comunicação. 09 de setembro de 2013.

Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/portal/destaque.php?cod=1302>>
Acesso em 17/02/2015.

CRANWELL, M.P.; HANCKOCK, R.D.; HIDSON, J.R.; HALL, S.A.; DANIEL, N.J.; HOPKINS, A.R.; WONNACOTT, B.; VIVAN, M.; HUNT, P. Bovine Spongiform Encephalopathy. **Veterinary Record**, v. 122, p. 190, 1988.

CREUTZFELDT, H.G. Über eine ungerwöhnliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems [On a particular focal disease of central nervous system]. Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Pschiatr v. 57, p. 1-18. In: SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.823-842, 2010.

DAGLEISH, M.P.; MARTIN, S.; STEELE, P.; FINLAYSON, J.; SISÓ, S.; HAMILTON, S.; CHIANINI, F.; REID, H.W.; GONZÁLES, L.; JEFFREY, M. Experimental transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy to European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 17-24, 2008.

DAWSON, M.; WELLS, G.A.H.; PARKER, B.N.J.; SCOTT, A.C. Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. **Veterinary Record**, v. 127, n. 13, p. 338, 1990.

DE BOSSCHERE, H.; ROELS, S.; VANOPDENBOSCH, E. Atypical case of bovine spongiform encephalopathy in East-Flemish cow in Belgium. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 7, n. 3, p.1-4, 2004.

DeARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. Etiology and pathogenesis of prion diseases. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 785-811, 1996.

DEL BO, R.; COMI, G.P.; CRIMI, M.; LOCATELLI, F.; MARTINELLI-BONESCHI, F. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. **Journal of Neurology**, v. 250, n. 6, p. 688-692, 2003.

DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL (DSA). **Relatório Anual de Febre Aftosa, 2014a**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal/programas/febreaftosa>>. Acesso em 29/01/2015.

DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL (DSA). Sistema Brasileiro de Prevenção e vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB). Cartilha. 2014b. Cartilha não publicada.

DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL (DSA). **Relação de Médicos veterinários habilitados para atuar no PNCEBT relacionados por Estado**. 2014c. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/animal/registros-e-autorizacoes/habilitacao-de-medicos>. Acessado em 28/01/2015.

DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS (DEFRA). Bovine Spongiform Encephalopathy – Chronology of events (as at 29 October 2010). **Scientific Information**, n. 1039, 1988. Disponível em: <<http://www.archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/bse/publications/documents/chronol.pdf>>. Acesso em 18/12/2014.

DERMAUT, B.; CROES, E.A.; RADEMAKERS, R.; VAN DEN, B.M.; CRUT, M.; HOFMAN, A. PRNP Val129 homozygosity increases risk of early onset Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 3, p. 409-412, 2008.

DOBLY, A.; LANGEVELD, J.; VAN KEULEN, L.; RODEGUIERO, C.; DURAND, S.; GEEROMS, R.; VAN MUYLEM, P.V.; SLOOVERE, J.; VANOPDENBOSCH, E.; ROELS, S. No H- and L-type cases in Belgium in cattle diagnosed with bovine spongiform encephalopathy (1999-2008) aging

seven years and older. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 26-33, 2010.

DOHERR, M.G.; HEIM, D.; VANDEVELDE, M.; FATZER, R. Modelling the expected number of preclinical and clinical cases of bovine spongiform encephalopathy in Switzerland. **Veterinary Record**, v. 145, p. 155-160, 1999.

DOHERR, M.G.; HEIM, D.; FATZER, R.; COHEN, C.H.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Targeted screening of high-risk cattle populations for BSE to augment mandatory reporting of clinical suspects. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, p. 3-16, 2001.

DONNELLY, C.A.; FERGUSON, N.M.; GHANI, A.C.; ANDERSON, R.M. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. **Proceeding of Royal Society**, v. 269, p. 2179-2190, 2002.

DUCROT, C.; ARNOLD, M.; DE KOEIJER, A.; HEIM, D.; CALAVAS, D. Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. **Veterinary Research**, v. 39, p.15-33, 2008.

DUDAS, S.; YANG, J.; GRAHAM, C.; CZUB, M.; MCALLISTER, T.A.; COULTHART, M.B.; CZUB, S. Molecular, biochemical and genetic characteristics of BSE in Canada. **PLoS ONE**, v. 5, n. R, p. 1-8, 2010.

DUDAS, S.; GRAY, J.; CLARK, R.; CZUB, S. Potential detection of oral transmission of H-type atypical BSE in cattle using in vitro conversion. **Anais do II Workshop Brazil-Canada on advances in the Science of prion and prion-like misfolding diseases**, p. 40, 2014.

ECONOMIC RESEARCH SERVICE (ERS/USDA). 2010

Disponível em:

<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?contentidonly=true&contentid=ERS_Agency_Splash.xml>. Acesso em 29/01/2015.

EDDY, R.G. Origin of BSE. **Veterinary Record**, v. 137, p. 648, 1995.

ELOIT, M.; ADJOU, K.; COULPIER, M.; FONTAINE, J.J.; HAMEL, R.; LILIN, T.; MESSIAEN, S.; ANDREOLETTI, O.; BARON, T.; BENCSIK, A.; BIACABE, A.G.; BERINGUE, V.; LAUDE, H.; LeDUR, A.; VILOTTE, J.L.; COMOY, E.; DESLYS, J.P.; GRASSI, J.; SIMON, S.; LANTIER, F.; SARRADIN, P. BSE agent signatures in a goat. **Veterinary Record**, v. 156, p. 523-524, 2005.

ESPINOSA, J.C.; MORALES, M.; CASTILLA, J.; ROGERS, M.; TORRES, J.M. Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1379-1383, 2007.

EUROPEAN COMMISSION (EC) DECISION 98/272/EC. Related to epidemiological surveillance of spongiform encephalopathies and which modifies Decision 94/474/EC. **Official Journal of the European Union**, l. 122, p. 59, 1998.

EUROPEAN COMMISSION (EC) DECISION 999/2001. Laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. **Official Journal of the European Union**, l. 147, p. 1-40, 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Report on evaluation of seven new rapid post mortem BSE tests. **EFSA Science Report**, v. 18, p. 1-13, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Evaluation of rapid post mortem TSE tests intended for small ruminants. **EFSA Journal**, v. 31, p. 1-17, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion of the European Food Safety Authority on a protocol for evaluation of new rapid BSE post mortem tests. **EFSA Journal**, v. 508, p.1-20, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European commission on the risk for human and animal health related to the revision of the BSE monitoring regime in some member states. **EFSA Journal**, v. 762, p. 1-47, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion of the European Food Safety Authority on the analytical sensitivity of approved TSE rapid tests. **EFSA Journal**, v. 7, n. 12, p. 1436, 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion of the European Food Safety Authority on the analytical sensitivity of approved TSE rapid tests – new data for assessment of two rapid tests. **EFSA Journal**, v. 8, p. 1591, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 21CFR589.2000. **Federal Register**, v. 6, 1997. Disponível em:
<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=589.2000>>. Acesso em 25/01/2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Compliance Program Guidance Manual**. Program 7371.009, 2003(a). Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/UCM113437.pdf>>. Acesso em 10/01/2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Report of inspection for compliance with 21 CFR nº 589.2000 and nº 589.2001.2003b**. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/ReportsManualsForms/Forms/UCM052412.pdf>>. Acesso em 25/01/2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Environmental Assessment for the IFR on Use of Materials Derived from Cattle in Human Food and Cosmetics**. 2004. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04n-0081-ea00001.pdf>>.

Acesso em: 22/12/2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 21 CFR Part 589. **Federal Regulation**, v. 73, n. 812008, p. 22720- 22758, 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/08-1180.pdf>>. Acesso em 22/12/2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Small entities compliance guide for renderers—substances prohibited from use in animal food or feed. 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052449.pdf>>. Acesso em: 23/12/2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 9 CFR part 301. **Federal Regulation**, 2004a. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/03-025if.pdf>>. Acesso em: 23/12/2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 69 FR 1885-1891. **Federal Register**, v. 69, n. 7, 2004b. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2004-01-12/pdf/04-624.pdf>>. Acesso em: 23/12/2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 9 CFR 310.22 - Specified risk materials from cattle and their handling and disposition. **Federal Regulation**, 2007. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fd5c6fa1-6599-4489-8c13-2c5207ecd966/9CFR_310.22.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em; 20/12/2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 9 CFR 319.5(b). **Federal Regulation**, 2011. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2011-title9-vol2/pdf/CFR-2011-title9-vol2-sec319-5.pdf>>. Acesso em: 23/12/2014.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 9 CFR parte 314 HANDLING AND DISPOSAL OF CONDEMNED OR OTHER INEDIBLE PRODUCTS AT OFFICIAL ESTABLISHMENTS. **Federal Regulation**, 2014. Disponível em: <<http://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/part-314>>. Acesso em: 20/12/2014.

FOSTER, J.D.; PARNHAM, D.; CHONG, A.; GOLDMAND, W.; HUNTER, R. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. **Veterinary Record**, v. 148, s. 6, p. 165-171, 2001.

FRASER, H.; DICKINSON, A.G. Scrapie in mice: agent strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 83, p. 29-40, 1973.

FUKUDA, S.; IWAMARU, Y.; IMAMURA, M.; MASUJIN, K.; SHIMIZU, Y.; MATSUURA, Y.; SHU, Y.; KURACHI, M.; KASAI, K.; MURAYAMA, Y.; ONOE, S.; HAGIWARA, K.; SATA, T.; MOHRI, S.; YOKOAMA, T.; OKADA, H. Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 53, p. 704-707, 2009.

GADJUSEK, D.C.; ZIGAS, V. Degenerative disease of central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of kuru in the native population. **New England Journal of Medicine**, v. 257, p. 974-978, 1958.

GAUCZYNSKI, S.; PEYRIN, J.M.; HAIK, S.; LEUCHT, C.; HUNDT, C.; RIEGER, R.; KRASEMANN, S.; DESLYS, J.P.; DORMONT, D.; LASMÉZAS, C.I.; WEISS, S. The 37-kDa/67-kDa lamin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **EMBO Journal**, v. 20, p. 5863-5875, 2001.

GAVIER-WIDÉN, D.; STACK, M.J.; BARON, T.; BALACHANDRAN, A.; SIMMONS, M.M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 509-527, 2005.

GAVIER-WIDÉN, D.; NÖREMARK, M.; LANGEVELD, J.P.M.; STACK, M.; BIACABE, A.G.; VULIN, J.; CHAPLIN, M.; RICHT, J.A.; JACOBS, J.; ACÍN, A.; MONLEÓN, E.; RENSTRÖM, L.; KLINGEBORN, B.; BARON, T.G.M. Bovine Spongiform Encephalopathy in Sweden: An H-Type Variant. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 2-10, 2008.

GELDEREN, C.; GIMENO, E.J.; SCHUDEL, A.A. Bovine spongiform encephalopathy in South America: a regional preventive approach. **Revue Scientifique et Technique**, v. 22, n. 1, p. 227-236, 2003.

GERSTMANN, J.; STRÄUSSLER, A.; SCHEINKER, I. Über eine eigenartige hereditary-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen Alterns [On a strange hereditary-familial disease of the central nervous system. At the same time of premature aging]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr*, v. 154, p. 736-762. In: SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.823-842, 2010.

GHANI, A.C.; FERGUSON, N.M.; DONNELLY, C.A.; ANDERSON, R.M. Predicted vCJD mortality in Great Britain. **Nature**, v. 406, p. 583-584, 2000.

GORDON, W.S. Advances in Veterinary Research. **Veterinary Research**, v. 58, p. 516-520, 1946.

GRASSI, J.; CREMINON, C.; FROBERT, Y.; FRETIER, P.; TURBICA, I.; REZAEI, H.; HUNSMANN, G.; COMOY, E.; DESLYS, J.P. Specific determination of the proteinase k-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post mortem diagnosis of BSE. **Archives of Virology**, v. 16, p. 197-205, 2000.

GRETZSCHEL, A.; BUSCHMANN, A.; EIDEN, M.; ZIEGLER, U.; LUHKEN, G.; ERHARDT, G.; GROSCHUP, M.H. Strain typing of german transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 55-63, 2005.

GULDIMANN, C.; GSPONER, M.; DROGEMULLER, C.; OEVERMANN, A.; SEUBERLICH, T. Atypical H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in a cow born after the reinforced feed ban on meat-and-bone meal in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 4171-4174, 2012.

HARTSOUGH, G.R.; BURGER, D. Encephalopathy of mink I: epizootiologic and clinical observations. **Journal of Infectious Diseases**, v. 115, p. 387-392, 1965.

HEGGEBO, R.; PRESS, C.M.; GUNNES, G.; LIE, K.I.; TRANULIS, M.A.; UVLUND, M. GROSCHUP, M.H.; LANDSVERK, T. Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2327-2337, 2000.

HEIM, D.; MUMFORD, E. The future of BSE from the global perspective. **Meat Science**, v. 70, p. 555-562, 2005.

HERZOG, C.; RIVIÈRE, J.; LESCOUTRA-ETCHEGARAY, N.; CHARBONNIER, A.; LEBLANC, V.; SALÈS, N.; DESLYS, J.P.; LASMÉZAS, C.I. PrP^{TSE} distribution in a primate model of variant, sporadic, and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. **Journal of Virology**, v.79, p. 14339-14345, 2005.

HILL, A.F.; DESBRUSLAIS, M.; JOINER, S.; SIDLE, K.C.; GOWLAND, I.; COLLINGE, J.; DOEY, L.J.; LANTOS, P. The same prion strain causes vCJD and BSE. **Nature**, v. 389, p. 448-450, 1997.

HOFFMANN, C.; ZIEGLER, U.; BUSCHMANN, A.; WEBER, A.; KUPFER, L.; OELSCHLEGEL, A.; HAMMERSCHMIDT, B.; GROSCHUP, M.H. Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1048-1055, 2007.

HOINVILLE, L.J.; WILESMITH, J.W.; RICHARDS, M.S. An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of feed ban. **Veterinary Record**, v. 136, p. 312-318, 1995.

HOPE, J.; WOOD, S.C.; BIRKETT, C.R.; CHONG, A.; BRUCE, M.A.; CAIRNS, D.; GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; BOSTOCK, C.J. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an

experimental isolate of natural scrapie. **Journal of General Virology**, v.80, p. 1-4, 1999.

HORIUCHI, M.; CAUGHEY, B. Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. **Structure**, v.7, p. R231–R240, 1999.

HU, W.; KIESEIER, B.; FROHMAN, E.; EAGAR, T.N.; ROSENBERG, R.N.; HARTUNG, H.; STUVE, O. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. **Journal of Neurological Sciences**, v. 264, p. 1-8, 2008.

IWAMARU, Y.; IMAMURA, M.; MATSUURA, Y.; MASUJIN, K.; SHIMIZU, Y.; SHU, Y.; KURACHI, M.; KASAI, K.; MURAYAMA, Y.; FUKUDA, S.; ONOE, S.; HAGIWARA, K.; YAMAKAWA, Y.; SATA, T.; MOHRI, S.; OKADA, H.; YOKOYAMA, T. Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1151-1154, 2010.

JACOBS, J.G.; LANGERVELD, J.P.; BIACABE, A.G.; ACUTIS, P.L.; POLAK, M.P.; GAVIER-WIDÉN, D.; BUSCHMANN, A.; CARAMELLI, A.; CASALONE, C.; MAZZA, M. GROSCHUP, M.; ERKENS, J.H.F.; DAVIDSE, A.; VAN ZIJDERVELD, F.G.; BARON, T. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1821-1827, 2007.

JEKANOWSKI, M. A Profile of the North American Rendering Industry. Informa Economics Inc, Washington, DC, EUA, 2010. Disponível em: <<https://d10k7k7mywg42z.cloudfront.net/assets/4dcab683dabe9d1c690006e d/techtopicsapr11.pdf>>. Acesso em 15/01/2015.

KIMBERLIN, R.H. Bovine Spongiform Encephalopathy: an appraisal of the current epidemic in the United Kingdom. **Intervirolgy**, v. 35, p. 208-218, 1993.

KIMBERLIN, R.H.; WILESMITH, J.W. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) epidemiology, low dose exposure and risks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 724, p. 210-220, 1994.

KITTELBERGER, R. Novel prion protein in BSE-affected cattle, Switzerland. To the editor. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 890-892, 2012.

KONG, Q.; ZHENG, M.; CASALONE, C.; QING, L.; HUANG, S.; CHAKRABORTY, B.; WANG, P.; CHEN, F.; CALI, I.; CORONA, C.; MARTUCCI, F.; IULINI, B.; ACUTIS, P.; WANG, L.; LIANG, J.; WANG, M.; LI, X.; MONACO, S.; ZANUSSO, G.; ZOU, W.Q.; CARAMELLI, M.; GAMBETTI, P. Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, 3697-3701, 2008.

KONOLD, T.; BONE, G.E.; CLIFFORD, D.; CHAPLIN, M.J.; CAWTHRAW, S.; STACK, M.J.; SIMMONS, M.M. Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. **Veterinary Research**, v. 8, p. 22-33, 2012.

KONOLD, T.; PHELAN, L.J.; CLIFFORD, D.; CHAPLIN, M.J.; CAWTHRAW, S.; STACK, M.J.; SIMMONS, M.M. The pathological and molecular but not clinical phenotypes are maintained after second passage of experimental atypical bovine spongiform encephalopathy in cattle. **BMC Veterinary Research**, [online] 10:243, 2014.

KOVACS, G.G.; PUOPOLO, M.; LADOGANA, A.; POCCHIARI, M.; BUDKA, H.; VAN DUIJN, C.; COLLINS, S.J.; BOYD, A.; GIULIVI, A.; COULTHART, M.; LAUPRETRE, N.D.; BRANDEL, J.P.; ZERR, I.; KRETZSCHMAR, H.A.; CUESTA, J.P.; LARA, M.C.; GLATZEL, M.; AGUZZI, A.; BISHOP, M.; KNIGHT, R.; BELAY, G.; WILL, R.; MITROVA, E. Genetic prion disease: the EUROCJD experience. **Human Genetics**, v. 118, p. 166-174, 2005.

LANGEVELD, J.P.; WANG, J.J.; VAN DE WEIL, D.F.; SHIH, G.C.; GARSSEN, G.J.; BOSSERS, A.; SHIH, J.C. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 1782-1789, 2003.

LARSKA, M.; POLAK, M.P.; ZMUDZINSKI, J.F.; TORRES, J.M. Comparison of mRNA expression. Levels of selected genes in the brain stem of cattle naturally infected with classical and atypical BSE. **Brain Research**, v. 1351, p. 13-22, 2010.

LASMÉZAS, G.I.; FOURNIER, J.G.; NOUVEL, V.; BOE, H.; MARCE, D. et al. Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications from human health. **Proceeding of National Academy of Science of United States of America**, v. 98, p. 4142-4147, 2001.

LEE, Y.H.; SIMMONS, M.M.; HAWKINS, S.A.C.; SPENCER, P.; WEBB, P.; STACK, M.J.; WELLS, G.A.H. Detection of Pathologic Prion Protein in the Olfactory Bulb of Natural and Experimental Bovine Spongiform Encephalopathy affected Cattle in Great Britain. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 59-62, 2009.

LEOPOLD, J.G. Nutzliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Land-Wirthschafft [Useful and experience-based introduction to farming]. Christian Friedrich Gunthern, Sorau, Germany, 1750. In: SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.823-842, 2010.

LEZMI, S.; MARTIN, S.; SIMMON, S.; COMOY, A.; BENCSIK, A.; DESLYS,

J.P.; GRASSI, J.; JEFFREY, M.; BARON, T. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheeps by use of Western blotting and immunohistochemical methods. **Journal of Virology**, v. 78, p. 3654-3662, 2004.

LEZMI, S.; RONZON, F.; BENCSIK, A.; BEDIN, A.; CALAVAS, D.; RICHARD, Y.; SIMON, S.; GRASSI, J.; BARON, T. PrP^C accumulation in organs of ARQ/ARQ sheep experimentally infected with BSE by peripheral routes. **Acta Biochemica**, v. 53, p. 399-405, 2006.

LOMBARDI, G.; CASALONE, C.; D'ANGELO, A.; GELMETTI, D.; TORCOLI, G.; BARBIERI, I.; CORONA, C.; FASOLI, E.; FARINAZZO, A.; FIORINI, M.; GELATI, M.; IULINI, B.; TAGLIAVINI, F.; FERRARI, S.; CARAMELLI, M.; MONACO, S.; CAPUCCI, L.; ZANUSSO, G. Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. **PLoS Pathogens**, [online] 4:e1000075, 2008.

LUGARESÍ, E.; MEDORI, R.; MONTAGNA, P.; BARUZZI, A.; CORTELLI, P.; LUGARESÍ, A.; TINUPER, P.; ZUCCONI, M.; GAMBETTI, P. Fatal Familial Insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 997-1003, 1986. In: SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.823-842, 2010.

MAIGNIEN, T.; LASMÉZAS, C.I.; BERINGUE, V.; DORMONT, D.; DESLYS, J.P. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. **Journal of General Virology**, v.80, p. 3035-3042, 1999.

MANUELIDIS, L. Transmissible encephalopathy agents: virulence, geography and clockwork. **Virulence**, v. 1, p. 101-104, 2010.

MASTERS, C.L.; HARRIS, J.O.; GADJUSEK, D.C.; GIBBS Jr, C.J.; BERNOULLI, C.; ASHER, D.M. Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and significance of familial and sporadic clustering. **Annals of Neurology**, v. 5, p. 177-188, 1979.

MASUJIN, K.; MATTHEWS, D.; WELLS, G.A.H.; MOHRI, S.; YOKOYAMA, T. Prions in the peripheral nerves of bovine spongiform encephalopathy-affected cattle. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1850-1858, 2007.

MASUJIN, K.; SHU, Y.; YAMAKAWA, Y.; HAGIWARA, K.; SATA, T.; MATSUURA, Y. IWAMARU, Y.; IMAMURA, M.; OKADA, H.; MOHRI, S.; YOKOYAMA, T. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Japanese black cattle. **Prion**, v. 2, p. 123-128, 2008

McBRIDE, P.A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; DONALDSON, M.; BRUCE,

M.; DIRINGER, H.; KRETZSCHMAR, H.A.; BEEKES, M. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. **Journal of Virology**, v. 75, p. 9320-9327, 2001.

McLEOD, A.H.; MURDOCH, H.; DICKINSON, J.; DENNIS, M.J.; HALL, G.A.; BUSWELL, C.M.; CARR, J.; TAYLOR, D.M.; SUTTON, J.M.; RAVEN, N.D. Proteolytic inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent. **Biochemical and Biophysical Research Community**, v. 317, p. 1165-1170, 2004.

MELONI, D.; DAVIDSE, A.; LANGEVELD, J.P.M.; VARELLO, K.; CASALONE, C.; CORONA, C.; BALKEMA-BUSCHMANN, A.; GROSCUP, M.H.; INGRAVALLE, F.; BOZZETTA, E. EU-approved rapid tests for bovine spongiform encephalopathy detect atypical forms: a study for their sensitivities. **PLoS ONE** [online] v. 7, e43133, 2012.

MILHAVET, O. LEHMANN, S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. **Brain Research**, v. 38, p. 328-339, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Lista de laboratórios oficiais da rede MAPA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/laboratorios/laboratorios-por-area-de-atuacao/diagnostico-animal-laboratorios-credenciados>>. Acesso em 18/12/14.

MOORE, J.; HAWKINS, S.A.C.; AUSTIN, A.R.; KONOLD, T.; GREEN, R.B.; BLAMIRE, I.W.; DEXTER, I.; STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; LANGERVELD, J.P.M.; SIMMONS, M.M.; SPENCER, Y.I.; WEBB, P.R.; DAWSON, M.; WELLS, G.A.H. Studies of the transmissibility of the agent of Bovine Spongiform Encephalopathy to the domestic chicken. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 1-13, 2011.

MOYNAGH, J.; SCHIMMEL, H. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. **Nature**, v. 400, p. 105-105, 1999.

NATHANSON N.; WILESMITH, J.; GRIOT, C. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, p. 959-969, 1997.

NATIONAL CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE RESEARCH & SURVEILLANCE UNIT (NCJDRSU). Variant Creutzfeldt-Jakob disease - current data (june 2014). Disponível em: <<http://www.cjd.ed.ac.uk/documents/worldfigs.pdf>>. Acesso em: 11/12/2014.

NONNO, R.; ESPOSITO, E.; VACCARI, G.; CONTE, M.; MARCON, S.; DI BARI, M.; LIGIOS, C.; DI GUARDO, G.; AGRIMI, U. Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine

spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4127-4133, 2003.

OESCH, B.; WESTAWAY, D. WALCHLI, M.; McKINLEY, M.P.; KENT, S.B.H.; AEBERSOLD, R.; BARRY, R.A.; TEMPST, P.; TEPLow, D.B.; HOOD, L.E.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v. 40, p. 636-637, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Bovine Spongiform Encephalopathy. In:____. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: OIE, 2010. P. 1-12.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Bovine Spongiform Encephalopathy. In:____. **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: OIE, 2014. P. 1-16.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). **BSE situation in the world and annual incidence rate. 2015**. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/>
Acesso em: 20/01/2015.

OKADA, H.; IWAMARU, Y.; IMAMURA, M.; MASUJIN, K.; MATSUURA, Y.; SHIMIZU, Y.; AKSAI, K.; MOHRI, S.; YOKOYAMA, T.; CZUB, S. Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. **Veterinary Research**, v.42, p. 79-89, 2011.

OKADA, H.; IWAMARU, Y.; KAKIZAKI, M.; MASUJIN, K.; IMAMURA, M.; FUKUDA, S.; MATSUURA, Y.; SHIMIZU, Y.; KASAI, K.; MOHRI, S.; YOKOYAMA, T. Properties of L-type bovine spongiform encephalopathy in intraespecies passages. **Veterinary Pathology**, v. 49, p. 819-823, 2012.

ONO, F.; TASE, N.; KUROSAWA, A.; HIYAOKA, A.; OHYAMA, A.; TEZUKA, Y.; WADA, N.; SATO, Y.; TOBIUME, M.; HAGIWARA, K.; YAMAKAWA, Y.; TERAOKA, K.; SATA, T. Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to Cynomolgus Macaques, a non-human primate. **Japanese Journal of Infectious diseases**, v. 64, p. 81-84, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Bovine Spongiform Encephalopathy**. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/bse/en/>. Acesso em: 13/11/2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). WHO Tables on Tissue Infectivity in Transmissible Spongiform Encephalopathies. **WHO Press**. Suíça, 2010.

PARCHI, P.; GIESE, A.; CAPELLARI, S.; BROWN, P. SCHULZ-SCHAEFFER, W.; WINDL, O.; ZERR, I.; BUDKA, H.; KOPP, N.; PICCARDO, P.; POSER, S.; ROJIANI, A.; STREICHEMBERGER, N.; JULIEN, J.; VITAL, C.; GHETTI, B.; GAMBETTI, P.; KRETZSCHMAR, H. Classification of

sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. **Annals of Neurology**, v. 46, p. 224-233, 1999.

PATTINSON, I.H.; HOARE, M.N.; JEBBET, J.N.; WATSON, W.A. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie affected sheep. **The British Veterinary Journal**, v. 130, p. 65-67, 1972.

PHILLIPS, N.; BRIDGEMAN, J.; FERGUSON-SMITH, M. **The BSE Inquiry: the report**, v.2, p.67-94, 2000.

PICCHI, V. Situação dos matadouros-frigoríficos no Brasil Central. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 3., 1998, Uberaba. **Anais..** p. 81-89.
Disponível em: <<http://www.abcz.org.br/site/eventos/anais/1998/81-89.doc>>
Acesso em: 18/08/2014.

POLAK, M.P.; ROZEK, W.; ROLA, J.; ZMUDZINSKI, J.F. Prion protein glycoforms from BSE cases in Poland. **Bulletin of Veterinary Institute of Pulawy**, v. 48, p. 201-215, 2004.

PRINCE, M.J.; BAILEY, J.A.; BARROWMAN, R.P.; BISHOP, K.J.; CAMPBELL, G.R.; WOOD, J.M. Bovine Spongiform Encephalopathy. **Revue Scientifique et Technique**, v. 22, n. 1, p. 37-60, 2003.

PRUSINER, S.B.; GADJUSEK, D.C.; ALPERS, M.P. Kuru with incubation periods exceeding two decades. **Annals of Neurology**, v. 212, p. 1-9, 1982.

PRUSINER, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13363–13383, 1998.

RICHT, J.A.; KUNKLE, R.A.; ALT, D.; NICHOLSON, E.M.; HAMIR, A.N.; CZUB, S.; KLUGE, J.; DAVIS, A.J.; HALL, M. Identification and characterization of two bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 142-154, 2007.

RODRIGUES, D.L. Análise de Sistema Brasileiro de Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2011.

RODRIGUES, D.L.; BARROS FILHO, I. R.; WARTH, J.F.G.; OLLHOFF, R.D. Análise das importações brasileiras como fatores de risco de difusão da Encefalopatia Espongiforme Bovina no país. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 51-57, 2013.

SAEGERMAN, C.; SPEYBROECK, N.; ROELS, S.; VANOPDENBOSCH, E.; THIRY, E.; BERKVEN, D. Decision Support Tools for Clinical Diagnosis of Disease in Cows with Suspected Bovine Spongiform Encephalopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 174-178, 2004.

SALA, C.; MORIGNAT, E.; OUSSAÏD, N.; GAY, E.; ABRIAL, D.; DUCROT, C.; CALAVAS, D. Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 74-79, 2012.

SCHALLER, O.; FATZER, R.; STACK, M.; CLARK, J.; COOLEY, W.; BIFFIGER, K.; EGLI, S.; DOHERR, M.; VANDEVELDE, M.; HEIM, D.; OESCH, B.; MOSER, M. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Acta Neuropathologica**, v. 98, p. 437-443, 1999.

SCHNEIDER, K.; FANGERAU, H.; MICHAELSEN, B.; RAAB, W.H. The early history of the transmissible spongiform encephalopathy exemplified by scrapie. **Brain Research Bulletin**, v. 77, p. 343-355, 2008.

SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; FATZER, R.; VANDEVELDE, M.; KRETZSCHMAR, H.A. Detection of PrP^{Sc} in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. **Archives of Virology**, v. 16, p. 173-180, 2000.

SEUBERLICH, T.; BOTTERON, C.; WENKER, C.; CAFÉ-MARÇAL, V.; OEVERMANN, A.; HAASE, B.; LEEB, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Spongiform Encephalopathy in a miniature zebu. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1950-1953, 2006.

SEUBERLICH, T.; BOTTERON, C.; BENESTAD, S.L.; BRUNISHOLZ, H.; WYSS, R.; KIHM, U.; SCHWERMER, H.; FRIESS, M.; NICOLIER, A.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 2-8, 2007.

SEUBERLICH, T.; HEIM, D.; ZURBRIGGEN, A. Atypical Transmissible Spongiform Encephalopathies in Ruminants: A challenge for Disease Surveillance and Control. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.823-842, 2010.

SEUBERLICH, T.; GSPONER, M.; DROGEMULLER, C.; POLAK, M.P.; McCUTCHEON, S.; HEIM, D.; OEVERMANN, A.; ZURBRIGGEN, A. Novel Prion Protein in BSE-affected cattle, Switzerland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n.1, p. 158-159, 2012a.

SEUBERLICH, T. Novel prion protein in BSE-affected cattle, Switzerland. In response. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 892, 2012b.

SHANKAR, S.K.; SATISHCHANDRA, P. Did BSE in UK originate from Indian subcontinent? **Lancet**, v. 366, p. 790-91, 2005.

SIMMONS, M.M.; HARRIS, P.; JEFFREY, M.; MEEK, S.C.; BLAMIRE, I.W.; WELLS, G.A.H. BSE in Great Britain; consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically

suspect cases. **Veterinary Record**, v. 138, p. 175-177, 1996.

SMITH, P.; BRADLEY, R. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and its epidemiology. **British Medical Bulletin**, v. 66, p. 185-198, 2003.

STACK, M.J.; KEYES, P.; SCOTT, A.C. The diagnosis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie by the detection of fibrils and the abnormal protein isoform. In: **Methods in molecular medicine: prion diseases**. Ed. BAKER, H.F.; RIDLEY, R.M, p. 85-104. Human Press, 1996.

STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; CLARK, J. Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH 1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. **Acta Neuropathologica**, v. 104, p. 279-286, 2002.

STACK, M. Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies. In: **Methods and tools in biosciences and medicine – techniques in prion research**, ed. LEHMANN, S.; GRASSI, J. P. 97-116. Birkhäuser Verlag, Berlin, Germany, 2004.

STACK, M.J.; FOCOSI-SNYMAN, R.; CAWTHRAW, S.; DAVIS, L.; CHAPLIN, M.J. Third atypical BSE case in Great Britain with H-type molecular profile. **Veterinary Record**, v. 165, p. 605-606, 2009.

STEVENSON, M.A.; MORRIS, R.S.; LAWSON, A.B.; WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.M.; JACKSON, R. Area-level risks for BSE in British cattle before and after the July 1988 meat and bone meal feed ban. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, p. 129-144, 2005.

TAYLOR, D.M. Inactivation of the unconventional agents of scrapie, bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. **Journal of Hospital Infection**, v.18, p. 141-146, 1991.

TAYLOR, D.M.; WOODGATE, S.L.; ATKINSON, M.J. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. **Veterinary Record**, v. 137, p. 605-610, 1995a.

TAYLOR, D.M.; FERGUSON, C.E.; BOSTOCK, C.J.; DAWSON, M. Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v. 136, p. 592, 1995b.

TAYLOR, D.M.; WOODGATE, S.L.; FLEETWOOD, A.J.; CAWTHORNE, R.J. Effect of rendering procedures on the scrapie agent. **Veterinary Record**, v. 141, p. 643-649, 1997.

TERRY, L.A.; MARSH, S.; RYDER, S.J.; HAWKINS, S.A.C.; WELLS, G.A.H.; SPENCER, Y.I. Detection of disease specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.152, p. 387-392, 2003.

TERRY, L.A.; JENKINS, R.; THORNE, L.; EVEREST, S.J.; CHAPLIN, M.J. et al. First case of H-type bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 160, p. 873-875, 2007.

TESTER, S.; JUILLERAT, V.; DOHERR, M.G.; HAASE, B.; POLAK, M.P.; EHRENSPERGER, F.; LEEB, T.; ZURBRIGGEN, A.; SEUBERLICH, T. Biochemical typing of pathological prion protein in aging cattle with BSE. **Virology Journal**, v. 6, p. 64-75, 2009.

THOMZIG, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; KRATZEL, C.; MAI, J.; BEEKES, M. Preclinical deposition of pathological prion protein in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. **Journal of Clinical Investigation**, v. 133, p. 1465-1492, 2004.

THURING, C.M.; ERKENS, J.H.; JACOBS, J.G.; BOSSERS, A.; VAN KEULEN, L.J.; GARSSSEN, G.J.; VAN ZIJDERVELD, E.G.; RYDER, S.J.; GROSCHUP, M.H.; SWEENEY, T.; LANGEVELD, J.P. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 972-980, 2004.

TORRES, J.M.; ANDREOLETTI, O.; LACROUX, C.; PRIETO, I.; LORENZO, P.; LARSKA, M.; BARON, T.; ESPINOSA, J.C. Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of H-type prion in homologous prion protein context. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1636-1644, 2011.

UNIÃO EUROPEIA (UE). European Commission. European Food Safety Authority. Report on the monitoring and testing of ruminants for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in the EU in 2012. Publicado em 09 de outubro de 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/annual_report_tse2012_en.pdf>. Acesso: 08/07/2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). 9 CFR partes 93, 94, 95, 96 e 98. **Federal Register**, v. 63, n. 3, p., 406-410, 1989. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/UCM162919.pdf>>. Acesso em 28/01/2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Summary Report. Epidemiological Investigation of Washington State BSE Case.** Março de 2004. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/bse/downloads/WashingtonState_epi_final3-04.pdf>. Acesso em: 15/11/2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Texas BSE investigation. **Final Epidemiology Report**. Agosto, 2005. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/bse/downloads/bse_final_epi_report8-05.pdf>. Acesso em 28/01/2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Alabama BSE investigation. **Final Epidemiology Report**. 02 de maio de 2006(a). Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/bse/downloads/EPI_Final5-2-06.pdf>. Acesso em 28/01/2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). An estimate of prevalence of BSE in the United States. Centers for Epidemiology and Animal Health, National Surveillance Unit. 2006 (b). Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/newsroom/hot_issues/bse/content/printable_version/BSEprevalence-estimated4-126-06.pdf>. Acesso em: 03/06/2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Update on the National Veterinary Accreditation Program. **APHIS Factsheet**, 2010. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_accreditation/downloads/fs_vet_accreditation.pdf>. Acesso em 25/01/2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Request for Upgrade Classification from Controlled to Negligible BSE Status. Submission Package from the United States of America. Outubro, 2011. Relatório não publicado.

University of South Hampton Environmental Health Unit.

Disponível em:

<<http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw-prion.gif>>. Acesso em 22/07/2014.

WADSWORTH, J.D.; COLLINGE, J. Update on human prion disease. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1772, p. 598-609, 2007.

WATHRALL, A.E. Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 16, p. 240-264, 1997.

WEISSMANN, C. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. The Ninth Datta Lecture. **FEBS Letters**, v. 389, p. 1-3, 1996.

WELLS, G.A.H.; SCOTT, A.C.; JOHNSON, C.T.; GUNNING, R.F.; HANCOCK, R.D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M.; BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, v. 121, p. 419-420, 1987.

WELLS, G.A.H.; HANCOCK, R.D.; COOLEY, W.A.; RICHARDS, M.S.;

HIGGINS, R.J.; DAVID, G.P. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medula oblongata. **Veterinary Record**, v. 125, p. 521-524, 1989.

WELLS, G.A.H.; WILESMITH, J.W.; MCGILL, I.S. Bovine Spongiform Encephalopathy: A Neuropathological Perspective. **Brain Pathology**, v. 1, p. 69-78, 1991.

WELLS, G.A.H.; WILESMITH, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. **Brain Pathology**, v. 5, p. 91-103, 1995.

WELLS, G.A.H.; DAWSON, M.; HAWKINS, S.A.C.; AUSTIN, A.R.; GREEN, R.B.; DEXTER, I.; HORIZAN, M.; SIMMONS, M.M. Bovine Spongiform Encephalopathy. In: Gibbs, C.J. (Ed.) **The BSE dilemma**. Springer, New York, p. 28, 1996.

WELLS, G.A.H.; HAWKINS, S.A.C.; GREEN, R.B.; AUSTIN, A.R.; DEXTER, I.; SPENCER, Y.; CHAPLIN, M.; STACK, M.J.; DAWSON, M. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. **Veterinary Record**, v. 142, p. 103-106, 1998.

WELLS, G.A.H.; HAWKINS, S.A.; AUSTIN, A.R.; RYDER, S.J.; DONE, S.H.; GREEN, R.B.; DEXTER, I.; DAWSON, M.; KIMBERLIN, R.H. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy in pigs. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1021-1031, 2003.

WELLS, G.A.H.; SPIROPOULOS, J.; HAWKINS, S.A.C.; RYDER, S.J. Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. **Veterinary Record**, v. 156, p. 401-407, 2005.

WELLS, G.A.H.; KONOLD, T.; ARNOLD, M.E.; AUSTIN, A.R.; HAWKINS, S.A.C.; STACK, M.; SIMMONS, M.M.; LEE, Y.H.; GAVIER-WIDÉN, D.; DAWSON, M.; WILESMITH, J.W. Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1363-1373, 2007.

WILESMITH, J.W.; WELLS, G.A.H.; CRANWELL, M.P.; RYAN, J.B. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. **Veterinary Record**, v. 123, p. 638-644, 1988.

WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.M.; ATKINSON, M.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies of the origin. **Veterinary Record**, v. 128, p. 199-203, 1991.

WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.M. Bovine Spongiform Encephalopathy: recent observations on the age-specific incidences. **Veterinary Record**, v. 130, p. 491-492, 1992a.

WILESMITH, J.W.; HOIVILLE, L.J.; RYAN, J.B.; SAYERS, A.R. Bovine Spongiform Encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. **Veterinary Record**, v. 130, p. 197-201, 1992b.

WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.; HUESTON, W.D.; HOIVILLE, L.J. Bovine Spongiform Encephalopathy; epidemiological features 1985 to 1990. **Veterinary Record**, v. 130, p. 90-94, 1992b.

WILESMITH, J.W.; WELLS, G.A.H.; RYAN, J.B.M.; GAVIER-WIDÉN, D.; SIMMONS, M.M. A cohort study to examine maternally-associated risk factors for Bovine Spongiform Encephalopathy. **Veterinary Record**, v. 141, p. 239-243, 1997.

WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; ZEIDLER, M.; ESTIBEIRO, K.; COUSENS, S.N.; SMITH, P.G., ALPEROVITCH, A.; POSER, S.; POCCHIARI, M.; HOFMAN, A. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in UK. **Lancet**, v. 347, p. 921-925, 1996.

WILLIAMS, E.S.; YOUNG, S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, p. 89-98, 1980.

WINTER, M.H.; ALDRIDGE, B.M.; SCOTT, P.R.; CLARKE, M. Occurrence of 14 cases of bovine spongiform encephalopathy in a closed dairy herd. **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 191-194, 1989.

WOLFGANG, P.; PAVEL, V. The field trial of seven new rapid post mortem tests for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in bovines. 2004. Disponível em:
<https://ec.europa.eu/jrc/institutes/irrm/activities/TSE_testing/Documents/globalreportphaseii.pdf>. Acesso em 18/04/2014.

WOOD, J.L.; MCGILL, I.S.; DONE, S.H.; BRADLEY, R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. **Veterinary Record**, v. 140, p. 167-174, 1997.

WYATT, J.M.; PEARSON, G.R.; SMERDON, T.N.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; WELLS, G.A.H. Spongiform encephalopathy in a cat. **Veterinary Record**, v. 126, p. 513, 1990.

XU, W.; XU, Y.; REUTER, T.; GILROYED, B.; JIN, L.; STANFORD, K.; LARNEY, F.J.; MCALLISTER, T.A. An improved design for biocontained composting of cattle mortalities. **Compost Science and Utilization**, v. 18 n. 1, p. 32-41, 2010.

XU, S.; REUTER, T.; GILROYED, B.H.; MITCHELL, G.B.; PRICE, L.M.; DUDAS, S.; BRAITHWAITE, S.L.; GRAHAM, C.; CZUB, S.; LEONARD, J.J.; BALACHANDRAN, A.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M.; MCALLISTER, T.A. Biodegradation of prions in compost. **Environmental Science and**

Technology, v. 48, p. 6909-6918, 2014.

YAMAKAWA, Y.; HAGIWARA, K.; NOHTOMI, K.; NAKAMURA, Y.; NISHIJIMA, M.; HIGUCHI, Y.; SATO, Y.; SATA, Y. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP^{RES}) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein Steer. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 221-222, 2003.

YASUDA, N; SCAFF, M. Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis – Doença de Creutzfeldt-Jakob e Encefalopatia Espongiforme Bovina. In: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Encefalopatia Espongiforme Transmissível**. Caderno Técnico. 1ª ed. Brasília. 118p. 2004.

10 ANEXO I

Formulário de Investigação de Doenças – INICIAL (FORM IN) e Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN).

| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| FORM IN | Formulário de Investigação de Doenças – INICIAL | 1. UF | 2. Nº | 3. Documento retificador? |
| | | | | <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Sim → (preencher item 16) |
| 4. Informações sobre a notificação ou motivo da investigação | | | | |
| 4.1. Fonte da notificação: | | 4.2. Motivo inicial para investigação da ocorrência: | | 4.3. Data e hora de recebimento da notificação ou do motivo da investigação: |
| <input type="radio"/> Propriedade <input type="radio"/> Vigilância pelo SVO <input type="radio"/> Terceiros | | <input type="radio"/> Sinais clínicos <input type="radio"/> Mortalidade <input type="radio"/> Vínculo epidemiológico → FORM IN vinculado: | | <input type="radio"/> Lesões/achados em matadouro <input type="radio"/> Resultado de teste de diagnóstico |
| 4.4. Descrição da notificação ou motivo da investigação: | | | | |
| | | | | |
| 5. Informações sobre o estabelecimento | | | | |
| Nome: | | Município de localização: | Unidade Regional: | |
| Proprietário: | | Telefone: | Código do proprietário: | Código do estabelecimento: |
| Endereço: | | Total de produtores: | | |
| Tipo: <input type="radio"/> Propriedade rural <input type="radio"/> Assentamento <input type="radio"/> Hospita/clínica veterinária <input type="radio"/> Unidade de pesquisa <input type="radio"/> Unidade militar <input type="radio"/> Sítio de aves migratórias <input type="radio"/> Sistema de criação predominante: <input type="radio"/> Intensivo <input type="radio"/> Semi-intensivo <input type="radio"/> Extensivo <input type="radio"/> Não se aplica | | | | |
| Endereço: <input type="radio"/> Aldeia indígena <input type="radio"/> Comunitário <input type="radio"/> Local para aglomeração <input type="radio"/> Sítios de de periferia <input type="radio"/> Confinamento | | | | |
| Datum utilizado: <input type="radio"/> WGS 84 <input type="radio"/> UTM <input type="radio"/> UTM 24 | | | | |
| Coordenadas geográficas → Latitude: <input type="text"/> ° <input type="text"/> ' <input type="text"/> '' OU <input type="text"/> ° <input type="text"/> ' <input type="text"/> '' | | | | |
| Formato Sexagesimal (Graus, Minutos e Segundos) OU Formato Grau decimal | | | | |
| Hemisfério: <input type="radio"/> Norte <input type="radio"/> Sul <input type="radio"/> H <input type="radio"/> V | | | | |
| 6. Informações sobre o contato principal no estabelecimento | | | | |
| Nome: | | Tel. Fixo: | Celular: | |
| Condição ou função no estabelecimento: <input type="checkbox"/> Proprietário <input type="checkbox"/> Produtor <input type="checkbox"/> Parente <input type="checkbox"/> Médico veterinário <input type="checkbox"/> Funcionário (administrador, capataz, caçador etc) | | | | |
| 7. Resultado da Investigação | | | | |
| 7.1. Data e hora de abertura do FORM-IN: (primeira visita do SVO) | | 7.2. Provável início da ocorrência: | 7.3. Investigação encerrada? | |
| dd/mm/aaaa | | dd/mm/aaaa | <input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não | |
| 7.4. O motivo inicial para investigação da ocorrência (itens 4.2 e 4.4) se enquadrava em suspeita de doença alvo da vigilância sindrômica? <input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não | | | | |
| 7.5. Após a investigação, a ocorrência se enquadra em qual das duas opções abaixo: | | | | |
| 7.5.1. Caso provável ou confirmado de doença-alvo da síndrome: <input type="radio"/> Vesicular <input type="radio"/> Hemorrágica dos suínos <input type="radio"/> Nervosa <input type="radio"/> Respiratória ou nervosa das aves <input checked="" type="radio"/> Desmarcar | | | | |
| OU | | | | |
| 7.5.2. Caso provável ou confirmado de outra doença ou caso descartado de doença-alvo sindrômica, com o seguinte diagnóstico: | | | | |
| Provável: _____ OU Conclusivo: _____ | | | | |
| 7.6. Descrição dos principais achados e ocorrências | | | | |
| 7.6.1. Anamnese e descrição dos sinais clínicos, das lesões e dos achados de necropsia (órgãos, lesões e alterações) | | | | |
| | | | | |
| 7.6.2. Observações gerais | | | | |
| | | | | |


8. Informações sobre a população de animais terrestres e características das explorações pecuárias existentes

| Animal | Faixas etárias ou espécies de aves | Animais existentes | | | No início da ocorrência | Casos | | Mortos | Abatidos sob inspeção | Destruídos | Examinados | Asintomáticos principais | Informar destino principal das explorações pecuárias existentes (de acordo com opções abaixo)** |
|----------------------|------------------------------------|--------------------|--------|--------|-------------------------|-------|-------------|--------|-----------------------|------------|------------|--------------------------|---|
| | | No dia da inspeção | Machos | Fêmeas | | Total | Confirmados | | | | | | |
| Bovinos | Até 12 m | | | | | | | | | | | | |
| | 13 a 24 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | 25 a 36 m | | | | | | | | | | | | |
| | > 36 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Bubalinos | Até 12 m | | | | | | | | | | | | |
| | 13 a 24 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | 25 a 36 m | | | | | | | | | | | | |
| | > 36 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Caprinos | Até 12 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 12 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Ovinos | Até 12 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 12 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Suínos | Até 6 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 6 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Equinos | Até 6 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 6 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Asininos | Até 6 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 6 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| Miaurinos | Até 6 m | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | > 6 m | | | | | | | | | | | | |
| | Total | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | |
| Aves | Galinhas | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| | Peru | | | | | | | | | | | | |
| | Anseriformes | | | | | | | | | | | | |
| | Ratitas | | | | | | | | | | | | |
| | Outras aves* | | | | | | | | | | | | |
| Total | | | | | | | | | | | | | |
| Abeļas | Colmeias | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| Lagomorfos (coelhos) | | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |
| Outra | | | | | | | | | | | | <input type="checkbox"/> | |

 * Outras aves: Codorna Perdiz Galinha D'Angola Psitaciformes Aves silvestres Passeriformes Faisão

** Tipos de destino: 1. Comércio de animais; 2. Comércio de produtos; 3. Consumo próprio; 4. Produção de biológicos; 5. Companhia; 6. Esporte/Lazer; 7. Trabalho

9. Indicar as características predominantes da exploração pecuária (tipo, finalidade e fase da produção)

| | |
|----------|--|
| Bov/bub | <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Mista <input checked="" type="radio"/> → <input type="checkbox"/> Ciclo completo <input type="checkbox"/> Cria/recria <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Terminação <input type="checkbox"/> Subsistência <input checked="" type="radio"/> |
| Caprinos | <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Mista <input checked="" type="radio"/> → <input type="checkbox"/> Ciclo completo <input type="checkbox"/> Cria/recria <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Terminação <input type="checkbox"/> Subsistência <input checked="" type="radio"/> |
| Ovinos | <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Mista <input type="checkbox"/> Lã <input checked="" type="radio"/> → <input type="checkbox"/> Ciclo completo <input type="checkbox"/> Cria/recria <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Terminação <input type="checkbox"/> Subsistência <input type="checkbox"/> Produção de lã <input checked="" type="radio"/> |
| Suínos | <input type="checkbox"/> Criatório (subsistência) <input checked="" type="checkbox"/> Granja → <input type="checkbox"/> Ciclo completo <input type="checkbox"/> UPL <input type="checkbox"/> Creche <input type="checkbox"/> Recria <input type="checkbox"/> Terminação <input type="checkbox"/> GRSC <input checked="" type="radio"/> |
| Equídeos | <input type="checkbox"/> Haras <input type="checkbox"/> Unidade Militar <input type="checkbox"/> Sociedade hípica <input type="checkbox"/> Jôquei clube <input type="checkbox"/> Propriedade de espera de abate <input type="checkbox"/> Propriedade fornecedora de equídeos <input checked="" type="radio"/> |
| Aves | <input type="checkbox"/> Subsistência <input type="checkbox"/> Ciclo completo <input type="checkbox"/> Ciclo parcial <input type="checkbox"/> Cria/recria <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Reprodução <input type="checkbox"/> Bisavoseiro <input type="checkbox"/> Avoseiro <input type="checkbox"/> Matriseiro <input type="checkbox"/> Incubatório <input checked="" type="radio"/> <input type="checkbox"/> Comercial corte <input type="checkbox"/> Comercial postura <input type="checkbox"/> Recria de postura <input type="checkbox"/> Recria de reprodução <input type="checkbox"/> Produção de ovos controlados <input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> Linha pura |
| Abeļas | <input type="checkbox"/> Rainha <input type="checkbox"/> Mel <input type="checkbox"/> Extrato de própolis <input type="checkbox"/> Própolis <input type="checkbox"/> Geleia real <input type="checkbox"/> Pólen <input type="checkbox"/> Apitoxina <input type="checkbox"/> Cera <input type="checkbox"/> Polinização |
| Coelhos | <input type="checkbox"/> Produção de carne <input type="checkbox"/> Comércio de pele ou pelo <input type="checkbox"/> Genética <input type="checkbox"/> Animal de laboratório |

10. Medidas adotadas no estabelecimento, pelo serviço veterinário oficial (não se aplica)
 Intendência Isolamento de animais Limpeza e desinfecção Combate a vetores Vacinação Vazio sanitário Introdução de sentinelas Sequestro de produtos Destruição de produtos

11. Provável origem:
 Não identificada
 * Avaliar os seguintes elementos: contato direto com animais doentes; vínculo epidemiológico com foco; restos de alimento; ração; águas ou pastagens comuns; cama de frangos, pavimentos, médicos veterinários, trabalhadores rurais, vizinhos, parentes, entre outros; propriedade vizinha; veículo contaminado; eventos pecuários; ingresso de animais (verificar origem e tempo); contato com animais silvestres (informar nome vulgar ou científico); contato com agentes químicos ou físicos; produtos ou subprodutos de origem animal; material de multiplicação animal; fômites (objetos, utensílios e equipamentos); via aerôgena; vetores; plantas tóxicas; medicamentos; vacinas; fezes/dejetos, relação genealógica; mesma origem dos animais.

11 ANEXO II

Formulário de Colheita e Envio de Tronco Encefálico para Diagnóstico de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis – EET.

**FORMULÁRIO DE COLHEITA E ENVIO DE TRONCO ENCEFÁLICO PARA
DIAGNÓSTICO DE ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS - EET -
(versão junho/2012)
EXCLUSIVO PARA VIGILÂNCIA EM MATADOUROS**

AMOSTRA: ____ / ____ / ____ / ____ (nº da amostra / SIF / UF / ano)

(uma amostra por frasco e por formulário)

A – Dados do remetente

| | |
|-------------------------------|---------------|
| Estabelecimento: | SIF: |
| Município/UF: | Telefone: () |
| Endereço: | Fax: () |
| Médico Veterinário Remetente: | CRMV-UF nº |
| E-mail: | |

B – Dados da procedência do animal

| | |
|--|---------------|
| Proprietário: | Propriedade: |
| ¹ Coordenadas: | Telefone: () |
| Município/UF: | |
| Lote: _____ Nº de animais: _____ Nº da GTA: _____ Nº de Identificação do Animal: _____ Nº da carcaça: _____ | |

¹se disponível.

C – Dados da amostra

| | | |
|---|---|---|
| 1. Tipo de morte (apenas uma opção) | <input type="checkbox"/> Encontrado morto no desembarque ao matadouro, OU <input type="checkbox"/> Encontrado morto nas instalações do matadouro; OU <input type="checkbox"/> Submetido ao abate de emergência – nesse caso, marcação obrigatória no <u>campo 2</u> . | |
| 2. Motivação para o abate de emergência (poderá assinalar mais de uma opção): | <input type="checkbox"/> Decúbito – animal alerta <input type="checkbox"/> Decúbito – animal prostrado <input type="checkbox"/> Caquexia ou doença crônica depauperante <input type="checkbox"/> Distúrbios nervosos – nesse caso, 0marcação obrigatória do <u>item 3</u> . | <input type="checkbox"/> Sialorréia <input type="checkbox"/> Fratura <input type="checkbox"/> Hipotermia <input type="checkbox"/> Hipertermia <input type="checkbox"/> Hemorragia <input type="checkbox"/> Fadiga <input type="checkbox"/> Outros (especificar): _____ |
| 3. Sinais clínicos nervosos (poderá assinalar mais de uma opção): | <input type="checkbox"/> Paralisia dos membros posteriores <input type="checkbox"/> Paralisia dos membros anteriores <input type="checkbox"/> Ataxia/Incoordenação <input type="checkbox"/> Movimentos de pedalagem <input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> Tremores | <input type="checkbox"/> Espasmos musculares <input type="checkbox"/> Nistagmo <input type="checkbox"/> Midríase <input type="checkbox"/> Opistótono <input type="checkbox"/> Outros (especificar): _____ |

D – Dados do animal

| | |
|---|---|
| Espécie: | <input type="checkbox"/> Bovina (se importado* citar o país de origem: _____) <input type="checkbox"/> Bubalina <input type="checkbox"/> Ovina <input type="checkbox"/> Caprina† |
| Sexo: <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea ² Idade (cronologia dentária): _____ anos | |
| Raça: _____ | |
| Categoria: <input type="checkbox"/> Aptidão leiteira <input type="checkbox"/> Corte (confinado/semi-confinado) <input type="checkbox"/> Corte (extensivo) | |

²idade: não utilizar os pontos de corte genéricos da GTA. A idade deve ser específica, em pontos de corte de meio em meio ano, como por exemplo: 3 anos, 3 anos e meio, etc.

Data de coleta: ____ / ____ / ____

Assinatura e carimbo do Médico Veterinário responsável

1ª via: Laboratório

2ª via: SSA/SISA/SFISA/SFA

3ª via: SIF

12 ANEXO III

USDA BSE Surveillance Submission Form e o USDA BSE Surveillance Data Collection Form.

According to the Paperwork Reduction Act of 1995, an agency may not conduct or sponsor, and a person is not required to respond to, a collection of information unless it displays a valid OMB control number. The valid OMB control number for this information collection is 0579-0409. The time required to complete this information collection is estimated to average .1 hours per response, including the time for reviewing instructions, searching existing data sources, gathering and maintaining the data needed, and completing and reviewing the collection of information.

OMB Approved
0579-0409
EXP.: 10/2016

| | | | |
|--|---|---|---|
| UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES P.O. BOX 844, 1920 DAYTON AVENUE AMES, IOWA 50010 515-337-7514 | BSE SURVEILLANCE SUBMISSION FORM | Page <input type="text"/> of <input type="text"/> | 1. BSE Referral Number <input style="width:100%; height: 20px;" type="text"/> |
|--|---|---|---|

| 2. SUBMITTED BY | 3. COLLECTION SITE |
|---|---|
| Name (including Business Name) <input style="width:90%;" type="text"/> NVSL Submitter ID <input style="width:10%;" type="text"/> | Premises ID (or Lat/Long) or FSIS Plant Number <input style="width:100%;" type="text"/> |
| Email <input style="width:100%;" type="text"/> | Name (including Business Name) <input style="width:100%;" type="text"/> |
| Phone <input style="width:30%;" type="text"/> Fax <input style="width:30%;" type="text"/> | Street <input style="width:100%;" type="text"/> |
| Street <input style="width:100%;" type="text"/> | City <input style="width:30%;" type="text"/> State <input style="width:10%;" type="text"/> ZIP Code <input style="width:10%;" type="text"/> |
| City <input style="width:30%;" type="text"/> State <input style="width:10%;" type="text"/> ZIP Code <input style="width:10%;" type="text"/> | Phone <input style="width:30%;" type="text"/> Fax <input style="width:30%;" type="text"/> |

Use separate submission form for each submitter, collector, collection site, and collection date combination. Attach a separate Bar Code Sticker (if available) for each sample in the spaces below. Attach a separate BSE Surveillance Data Collection Form (VS 17-131) for each animal. Sample IDs on this form match Sample IDs on BSE Surveillance Data Collection Forms.

| 5. COLLECTION SITE TYPE (select only one) | 6. COLLECTED BY or <input type="checkbox"/> if Same as Submitted by |
|--|---|
| <input type="radio"/> Slaughter Plant <input type="radio"/> Public Health Lab <input type="radio"/> Diagnostic Lab <input type="radio"/> Renderer <input type="radio"/> On Farm <input type="radio"/> 3D-4D <input type="radio"/> Other (describe) <input style="width:50%;" type="text"/> | Name (including Business Name) <input style="width:100%;" type="text"/> |

| 7. SAMPLE INFORMATION | |
|---|---|
| Number of Samples <input style="width:100px;" type="text"/> | Street <input style="width:100%;" type="text"/> |
| Preservation <input type="radio"/> Ice Pack <input type="radio"/> Other <input style="width:50%;" type="text"/> | City <input style="width:30%;" type="text"/> State <input style="width:10%;" type="text"/> ZIP Code <input style="width:10%;" type="text"/> |
| | Phone <input style="width:30%;" type="text"/> Fax <input style="width:30%;" type="text"/> |
| | Email <input style="width:100%;" type="text"/> |

| | | | |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 1 BSE Sample ID | 5 BSE Sample ID | 9 BSE Sample ID | 13 BSE Sample ID |
| 2 BSE Sample ID | 6 BSE Sample ID | 10 BSE Sample ID | 14 BSE Sample ID |
| 3 BSE Sample ID | 7 BSE Sample ID | 11 BSE Sample ID | 15 BSE Sample ID |
| 4 BSE Sample ID | 8 BSE Sample ID | 12 BSE Sample ID | 16 BSE Sample ID |

8. Additional Data (attach additional page(s) if needed)

| | | | |
|---------------------|------------------------------|-------------|------------------|
| 9. Shipping Date | 10. Signature of Submitter | | |
| 11. Destination Lab | 12. Shipment Tracking Number | | Accession Number |
| Condition Received | Distribution | Received by | |

