



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**Estudos epidemiológicos para fundamentar a
implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil**

GERALDO MARCOS DE MORAES

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
AGOSTO/2018



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

Estudos epidemiológicos para fundamentar a implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil

GERALDO MARCOS DE MORAES

ORIENTADOR: VÍTOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA VETERINÁRIA

**LINHA DE PESQUISA: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS
ANIMAIS E GESTÃO DOS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA**

PUBLICAÇÃO: 08/2018

BRASÍLIA/DF

AGOSTO/2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

Estudos epidemiológicos para fundamentar a implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil

GERALDO MARCOS DE MORAES

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:

VITOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES, Prof. Dr. (UnB)
(ORIENTADOR)

FABIANO JOSÉ FERREIRA DE SANT'ANA, Prof. Dr. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

FERNANDO FERREIRA, Prof. Dr. (USP)
(EXAMINADOR EXTERNO)

MANUEL SANCHEZ VAZQUEZ, Dr. (PANAFTOSA)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 30 DE JULHO DE 2018

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MORAES, G.M. Estudos epidemiológicos para fundamentar a implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 220 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM827e Moraes, Geraldo Marcos de
Estudos epidemiológicos para fundamentar a implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil / Geraldo Marcos de Moraes; orientador Vítor Salvador Picão Gonçalves. -- Brasília, 2018.
230 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Saúde Animal) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. erradicação. 2. transmissão viral. 3. vigilância sorológica. 4. testes DIVA. 5. proteína não-estrutural. I. Gonçalves, Vítor Salvador Picão, orient. II. Título.

*À Gláucia, Jade e Júlia
Aos meus pais, José Estanislau e Lúcia Garcia*

AGRADECIMENTOS

Este doutorado foi realizado em conformidade com as políticas de capacitação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Manifesto meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o alcance dos seus objetivos, com especial atenção:

Ao prof. *Vítor Gonçalves*, meu orientador, pelo reconhecimento e estímulo e pela construção conjunta deste trabalho.

Aos profs. *Fernando Ferreira* e *José Henrique Grisi-Filho*, pelas inestimáveis contribuições durante meu exercício profissional e pela leitura crítica e construtiva da maior parte dos capítulos desta tese.

A *Antônio Mendes da Silva*, exemplo de profissional capaz e dedicado, pela amizade e ensinamentos ao longo do meu trabalho na IAGRO-MS e no MAPA. Sua participação foi fundamental para a elaboração do Capítulo 7 desta tese.

A *Jamil Gomes de Souza*, pela honesta e produtiva convivência no dia a dia do MAPA, e pelas especiais contribuições para o primeiro Capítulo.

A *Helio Vilela*, pela prazerosa e sincera convivência, e pelas contribuições para qualidade final deste trabalho.

A *Márcia Mourão*, pela estimulante convivência e pelo apoio na tradução para o inglês.

A *Rossana Allende*, pelo exemplo profissional e pelas contribuições ao Capítulo 7.

A *Eliana Lara* e *Diego Viali dos Santos* pelas contribuições em parte dos capítulos desta tese.

Ao prof. *Marlon Brisola*, pela participação na elaboração do segundo Capítulo da tese.

Aos colegas do Departamento de Saúde Animal, dos Serviços Veterinários Estaduais e das Superintendências Federais de Agricultura, com os quais tive oportunidade de dividir vários desafios profissionais.

Aos colegas da rede de laboratórios do MAPA (LANAGROs), pela disponibilidade e qualidade do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EpiPlan), pela agradável, descontraída e produtiva convivência.

Por fim, às amigas *Márcia Mourão*, *Francianne Assis*, *Maria do Carmo* e *Valéria Homem*, pelas quais nutro grande admiração e que me prestaram uma linda e sincera homenagem, colhendo testemunhos de amigos com os quais tive a grata satisfação de conviver ao longo de minha vida profissional. Agradeço imensamente, a todos que se manifestaram, pelas gentis palavras e reconhecimento.

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi o de demonstrar a contribuição de estudos epidemiológicos para o reconhecimento e manutenção de zonas livres de febre aftosa no Brasil. Este tipo de estudo foi incorporado ao sistema de vigilância da doença a partir do final da década de 1990, e desempenhou papel fundamental para apoiar a certificação de ausência de transmissão viral, tanto nos pleitos nacionais enviados à Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, como nos acordos bilaterais visando a manutenção e ampliação de mercados para exportação. Os estudos surgiram como evolução do conhecimento e das estratégias de luta contra a doença, de forma que o trabalho se inicia, nos dois primeiros capítulos, com uma revisão histórica, detalhando as principais fases e ocorrências de intervenção zoossanitária no país. A análise histórica parte dos primeiros registros de ingresso da doença na América do Sul e no Brasil e finaliza com o reconhecimento de todo território nacional como livre da doença, em 2018. Nos três capítulos seguintes são descritos os últimos estudos epidemiológicos conduzidos pelo serviço veterinário brasileiro, que apoiaram a ampliação e manutenção da zona livre de febre aftosa com vacinação. A estratégia básica utilizada nesses estudos envolveu delineamento para detecção realizado em duas etapas, com implantação de atividades longitudinais de avaliação clínica e de colheita de amostras de soro sanguíneo para identificação de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNE) do vírus da febre aftosa, por meio dos denominados DIVA tests (“testes para diferenciar animais infectados e vacinados”), assim como em análises espaciais para avaliar possível formação de clusters da doença. Os resultados obtidos mostraram-se incompatíveis com transmissão viral, permitindo apoiar a certificação da condição de zona livre de febre aftosa com vacinação. No capítulo 6, é apresentado estudo de repetibilidade do ensaio ELISA 3ABC, utilizado como teste de triagem em estudos de transmissão viral conduzidos no país. O estudo envolveu uma abordagem quantitativa, baseada nos valores de PIn (percentual de inibição), e uma avaliação de concordância com base nos resultados discretos (positivo ou negativo, frente ao ponto de corte $PIn \geq 50\%$). Foi observada expressiva variabilidade para os valores de PIn, fato que, entretanto, não alterou a classificação final das amostras, obtendo-se altas taxas de concordância para os resultados discretos, contribuindo para demonstrar boa confiança para os estudos epidemiológicos conduzidos com objetivo de apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da FA em zonas livres com vacinação. A tese é finalizada com a descrição de estudo experimental, do tipo longitudinal com intervenção, delineado com objetivo de avaliar a possível indução de anticorpos contra PNE por algumas vacinas produzidas no país, utilizadas em diferentes esquemas de vacinação. Com base nas vacinas avaliadas, apesar do estudo revelar evidente redução de reatividade induzida pela vacinação, apontou para persistência, mesmo que em níveis mais reduzidos, de associação entre a prática da vacinação e a presença de resultados positivos ou indeterminados ao sistema laboratorial utilizado nos estudos de avaliação de transmissão viral.

Palavras chaves: erradicação, transmissão viral, vigilância sorológica, testes DIVA, proteínas não-estruturais.

ABSTRACT

The overall objective of this work was to demonstrate the contribution of epidemiological studies for the recognition and maintenance of FMD-free zones in Brazil. This type of study was used by the disease surveillance system since the late 1990s, and played a key role in supporting the certification of absence of FMD viral transmission, both for applications sent to the World Organisation for Animal Health-OIE, and bilateral commercial agreements aimed at the maintenance and expansion of beef export markets. These studies were part of a wider effort to integrate new knowledge into the strategies to eradicate FMD, so that the document begins, in the first two chapters, with a historical review, detailing the main stages in animal health interventions in Brazil. The historical analysis starts with the earliest records of introduction of the disease in South America and in Brazil and ends with the recognition of national territory as free from the disease, in 2018. The three following chapters describe the recent epidemiological studies carried out by the Brazilian official veterinary service, which supported the expansion and maintenance of foot-and-mouth disease-free zone with vaccination. The basic strategy of these epidemiological studies involved the statistical sampling design for detection of viral circulation carried out in two stages, with longitudinal clinical evaluations and blood serum sampling for diagnostic aiming the detection and identification of antibodies against non-structural proteins (NSP) of FMD virus using the so-called DIVA tests (tests to distinguish between vaccinated and infected animals), as well as spatial analysis to assess possible detection of disease clusters. The results obtained were incompatible with viral transmission, therefore, providing strong evidence to support the certification of FMD-free zone with vaccination. Chapter 6 presents a study on repeatability of ELISA 3ABC test, used as a screening test in the viral transmission evaluation studies carried out in Brazil. The analytical approach was based on the values of PIn (percentage of inhibition), and on a measure of agreement based on a discrete variable (positive or negative result, according the cut-off point $PIn \geq 50\%$). Significant variability was observed for the PIn values. However, this did not impact the final classification of the samples, as we observed high rates of agreement of the discrete results. This increases the confidence on the epidemiological studies carried out to support the certification of absence of FMDV transmission in the free zone with vaccination. Finally, the document is completed with the description of a longitudinal experimental field trial, designed to evaluate the possible induction of antibodies against NSP for some vaccines manufactured in the country, under different vaccination schemes. Although the study shows a reduction in reactivity induced by vaccination with the vaccines tested in this trial, it also revealed the persistence, at low levels, of association between vaccination and the presence of positive or inconclusive results to the diagnostic protocol.

Key words: eradication, viral transmission, serological surveillance, DIVA tests, non-structural proteins.

APRESENTAÇÃO

Esta tese aborda estudos com febre aftosa e traz como questão principal a avaliação de transmissão viral em rebanhos submetidos à vacinação sistemática contra a doença, o que adquiriu diferenciada relevância a partir do final da década de 1990, quando se iniciaram os procedimentos para reconhecimento de zonas livres onde se pratica a vacinação, com base nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE. Neste contexto, os estudos epidemiológicos surgiram como importante componente do sistema de vigilância implantado nos países da América do Sul, e o presente trabalho disponibiliza um pouco da experiência brasileira sobre o tema. Evidentemente que estudos epidemiológicos envolvem um leque amplo de finalidades e de abordagens metodológicas, mas aqui estão limitados àqueles conduzidos pelo serviço veterinário oficial com objetivo de avaliação de transmissão do agente viral.

A tese está organizada em sete capítulos que, apesar de associados e complementares, estão estruturados de forma a lhes permitir leitura e avaliação em separado. Foram elaborados com vistas à produção de artigos científicos, buscando atender um dos objetivos perseguidos neste exercício acadêmico: dar publicidade técnica a trabalhos executados pelo serviço veterinário oficial.

Considerando que os estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral surgiram como consequência da evolução histórica na área de conhecimento e de intervenção contra a febre aftosa, optou-se por incluir no trabalho uma revisão sobre a atuação contra a doença no Brasil. A revisão está disponibilizada nos dois capítulos iniciais e revelou-se especial, uma vez que, no ano de publicação desta tese, comemora-se o reconhecimento pela OIE de todo o território nacional como livre da doença. No primeiro capítulo, a abordagem histórica inclui dados e informações de acontecimentos nacionais e internacionais que interferiram em atividades de controle e erradicação da doença no país; síntese sobre os principais estudos epidemiológicos realizados a partir da década de 1970; e informações sobre a evolução geográfica e temporal referente à implantação de zonas livre de febre aftosa no território nacional, encerrando com a descrição da condição sanitária para a doença na América do Sul até maio de 2018, segundo a OIE. No Capítulo 2, a análise histórica centra-se no contexto institucional, especialmente a partir da revisão da luta contra a doença em 1992, momento em que a participação social nas ações de intervenção contra a doença foi fortalecida, com destaque para criação dos fóruns representados pelas reuniões dos circuitos pecuários coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. O texto deste capítulo surgiu como produto da disciplina “Evolução do Agronegócio” do Programa de Pós-Graduação em Agronegócios – PROPAGA, da Universidade de Brasília, e está publicado no primeiro número da revista “*Savannah Journal of Research and Development*”, com coautoria dos professores Marlon Vinícius Brisola e Vitor Salvador Picão Gonçalves.

Nos demais capítulos estão apresentados e discutidos estudos epidemiológicos realizados no Brasil em apoio ao Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA, com particular interesse ao reconhecimento de zonas livres de febre aftosa. Especificamente nos Capítulos 3 a 5 estão descritos os últimos estudos de avaliação de transmissão viral conduzidos no país que, apesar de possuírem o mesmo objetivo, ou seja, apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da febre aftosa, foram realizados em contextos e realidades geográficas e produtivas muito diversas, o que lhes confere características distintas e inovadoras. Assim, no Capítulo 3 está detalhado o estudo para apoiar o pleito de reconhecimento dos Estados da Região Nordeste mais parte do Estado do Pará como zona livre de febre aftosa com vacinação, reconhecimento que foi confirmado pela OIE em 2014; no Capítulo 4, é apresentado o estudo conduzido com objetivo de apoiar a demonstração de ausência de transmissão viral na zona livre de febre aftosa com vacinação implantada no Brasil em 2014; e, no Capítulo 5 está disponibilizado o estudo conduzido em Estados da Região Norte, que contribuiu para inclusão, em 2018, de todo território nacional em zonas livres de febre aftosa reconhecidas pela OIE.

Nos dois últimos capítulos (6 e 7) também estão apresentados estudos epidemiológicos conduzidos pelo MAPA, relacionados a questões sobre ensaios laboratoriais utilizados nos estudos de avaliação de transmissão do vírus da febre aftosa. No Capítulo 6, está disponibilizado estudo de repetibilidade do teste ELISA 3ABC em laboratórios do MAPA, utilizado como prova de triagem nos estudos de avaliação de transmissão viral a partir de 2000, e, portanto, representante dos denominados *DIVA tests (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals)*, e, no Capítulo 7, está detalhado o experimento a campo conduzido em zona livre com vacinação, entre 2009 e 2011, com objetivo de avaliar a detecção de anticorpos contra proteínas não-estruturais do vírus da febre aftosa induzidos pela vacinação.

Todos os estudos que compõem esta tese, apresentam-se como fruto de trabalho coletivo, destacando-se a participação de profissionais do serviço veterinário oficial nos estados envolvidos (Serviços Veterinários Estaduais e Superintendências Federais de Agricultura); da rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS/MAPA); de setores do Departamento de Saúde Animal (DSA) e da Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários (CGAL), vinculados à Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA), além de contribuições específicas de profissionais do Centro PanAmericano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) e do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LEB – FMVZ – USP).

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 01. Relação dos principais estudos epidemiológicos realizados com objetivo de apoiar os pleitos de reconhecimento da condição de zona livre de febre aftosa junto à OIE, 1997 a 2017, Brasil.	57
Tabela 02. Síntese sobre a evolução da condição sanitária para febre aftosa no Brasil, segundo reconhecimento pela OIE	64

Capítulo 2

Capítulo 3

Tabela 01. Informações sobre o total de UPAs constituídas e propriedades rurais selecionadas em cada subpopulação amostral, incluindo total existente de animais susceptíveis, população estudada e animais amostrados nas UPAs.	104
Tabela 02. Informações sobre o total de UPAs e animais selecionados por subpopulação amostral.	104
Tabela 03. Informações sobre as unidades elementares de amostragem, registradas durante a primeira coleta de amostras.	104
Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta, por subpopulação amostral	106
Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à coleta pareada, nas UPAs sem animais soropositivos, mas com pelo menos um bovino indeterminado na coleta 1, por subpopulação amostral	107
Tabela 06. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante soropositivo na coleta 1, por subpopulação amostral	107

Capítulo 4

Tabela 01. Informações sobre a área geográfica e rebanho bovino existente na zona livre de febre aftosa com vacinação, no início de 2014, segundo as subpopulações amostrais consideradas no estudo	132
Tabela 02. Informações sobre os períodos de realização das atividades iniciais de constituição das UPAs e de primeira coleta, bem como sobre a amostragem realizada, por subpopulação amostral.....	133
Tabela 03. Total de bovinos amostrados por subpopulação amostral, segundo grupo etário e origem dos animais	134
Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta.....	136
Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs sem bovinos soropositivos, mas com pelo menos um bovino indeterminado na primeira coleta.	136
Tabela 06. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino soropositivo na primeira coleta.....	136
Tabela 07. Classificação das UPAs de acordo com a distância linear para o vizinho mais próximo, por subpopulação amostral e segundo a classificação após os resultados dos testes sorológicos da primeira coleta.....	137
Tabela 08. Resumo dos resultados da análise puramente espacial, com modelo <i>Bernoulli</i> , para <i>clusters</i> positivos, nível de significância de 5%, e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km.....	140
Tabela 09. Custos gerais do estudo, em dólar americano, segundo categoria de despesa e UF.	141

Capítulo 5

Tabela 01. Informações gerais sobre as regiões envolvidas no estudo de avaliação de transmissão do vírus da FA.....	154
Tabela 02. Informações sobre a amostra prevista e realizada, total de propriedades envolvidas, rebanhos susceptíveis existentes e total de amostras coletadas, segundo categoria de tamanho de rebanho e subpopulação amostral	163
Tabela 03. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta, por subpopulação amostral	164
Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs sem animais soropositivos, mas com pelo menos um animal indeterminado na coleta 1, por subpopulação amostral	164
Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino ou bubalino soropositivo na coleta 1, por subpopulação amostral	164
Tabela 06. Total de UPAs segundo a distância entre o vizinho mais próximo e a classificação com base nos resultados sorológicos da primeira coleta, por subpopulação amostral	168
Tabela 07. Resumo dos resultados para varredura espacial, considerando análise puramente espacial, com modelo <i>Bernoulli</i> , para <i>clusters</i> positivos, nível de significância de 5%, e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km.....	171
Tabela 08. Custos gerais do estudo, em dólar americano, segundo categoria de despesa e UF.....	172

Capítulo 6

Tabela 01. Frequências das células das tabelas de contingência e valores das estatísticas complementares, segundo laboratório e grupos de análise.....	191
Tabela 02. Índices de concordância bruta e esperada, coeficiente Kappa (AC_1) e estatísticas complementares ao teste de concordância, segundo laboratório e grupos de análise.....	192

Capítulo 7

Tabela 01. Total de unidades experimentais segundo coorte, vacina e propriedade rural.....	205
Tabela 02. Síntese sobre o total de bovinos, amostras coletadas e processadas e doses aplicadas de vacina, segundo resultado laboratorial e coortes	211
Tabela 03. Informações sobre sexo e idade dos animais selecionados para constituição das coortes com intervenção, ao início do experimento, segundo coorte e vacina utilizada.....	212
Tabela 04. Relação dos animais eliminados ou censurados antes do término do período de observação, acompanhada do total de sangrias consideradas no estudo, segundo coorte, propriedade rural, tipo e causa de ocorrência	214
Tabela 05. Distribuição do número de amostras positivas (Pos) e indeterminadas (Ind), segundo vacina, coorte CN e número de vacinações, agrupado nos períodos inicial, médio e final dos dias de observação.....	214
Tabela 06. Total de bovinos e amostras avaliadas, segundo coorte com e sem intervenção, vacinas utilizadas e resultados obtidos	216
Tabela 07. Informações sobre unidade-tempo, falhas e função acumulativa $F(t)$, por vacina e cenários 1 e 2... 217	
Tabela 08. Informações sobre a coorte C3 utilizada para simular o sistema de avaliação de pureza das vacinas contra a FA, com respectivo grupo controle negativo (CN), segundo propriedade rural e cenários 1 e 2	217
Tabela 09. Resultados de parte da coorte C3 utilizada para simular o sistema de avaliação de pureza das vacinas contra a FA, segundo as vacinas utilizadas e cenários 1 e 2.....	218
Tabela 10. Resultado da análise de associação entre a variável número de vacinações e o desfecho investigado, segundo cenários 1 e 2	219
Tabela 11. Resultados das coortes C1 e C2, segundo dias após última vacinação e cenários 1 e 2	220

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 01. Evolução histórica de ações e fatos relacionados ao controle e à erradicação da febre aftosa no Brasil.....	28
Figura 02. Definição dos circuitos pecuários, Brasil, 1992.....	41
Figura 03. Ocorrência anual de febre aftosa, percentual de animais vacinados e total de carne exportada, Brasil, 1970 a 2017.....	45
Figura 04. Quadrantes epidemiológicos com registro semanal de doença vesicular acumulados por series anuais	49
Figura 05. Taxa de rebanhos afetados por febre aftosa, segundo declaração do proprietário	51
Figura 06. Esquema simplificado dos ecossistemas de febre aftosa: 1) condição anterior à implantação de um programa de erradicação; 2) condição após a primeira fase de um programa de erradicação (adaptado de Rosenberg e Goic, 1973).....	52
Figura 07. Ecossistemas de febre aftosa, 1981 (A), e regiões da pecuária brasileira como determinantes de febre aftosa (B).....	54
Figura 08. Síntese histórica dos estudos epidemiológicos para febre aftosa realizados no Brasil, 1975 a 2017.....	58
Figura 09. Evolução geográfica e temporal da implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil.....	65
Figura 10. Condição zoossanitária para febre aftosa na América do Sul, segundo OIE, maio de 2018.....	67

Capítulo 2

Figura 01. Definição dos circuitos pecuários	83
Figura 02. Condição atual para febre aftosa.....	84

Capítulo 3

Figura 01. Área geográfica envolvida no estudo de avaliação de transmissão do vírus da FA, Brasil, 2014	92
Figura 02. Agrupamento da região de estudo em subpopulações amostrais, com destaque do grau de independência.....	103
Figura 03. Localização geográfica das sedes das propriedades rurais que participaram do estudo	105
Figura 04. Distribuição geográfica das UPAs, com destaque para UPAs com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante soropositivo após a coleta pareada.....	109

Capítulo 4

Figura 01. Condição zoossanitária para febre aftosa no Brasil, ao final de 2016, com destaque para a área envolvida no estudo.....	122
Figura 02. Representação geográfica das subpopulações amostrais	131
Figura 03. Percentual mensal de propriedades com realização da primeira coleta de amostras, por subpopulação amostral	133
Figura 04. Distribuição dos municípios de alta movimentação, segundo o total de UPAs por município.....	133
Figura 05. Percentual de bovinos nascidos nas propriedades rurais, segundo histórico de vacinação, por subpopulação amostral	134
Figura 06. Distribuição geográfica das UPAs, segundo resultado sorológico após primeira coleta	138
Figura 07. Representação da distribuição das distâncias lineares das UPAs em relação ao vizinho mais próximo, por subpopulação amostral	138
Figura 08. Representação gráfica do resultado da análise espacial para detecção de <i>clusters</i> por meio da <i>Função-K</i>	139

Capítulo 5

Figura 01. Condição zoossanitária para FA na América do Sul, ao final de 2016, com destaque para a área envolvida no estudo	154
Figura 02. Detalhes geográficos das áreas envolvidas no estudo	155
Figura 03. Organização do estado do Amazonas e zona de proteção do Pará em três subpopulações amostrais	157
Figura 04. Quantidade mensal de UPAs com primeira coleta de amostras, segundo subpopulação amostral	161
Figura 05. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo realizado na Sub1 (Amapá e Pará)..	167
Figura 06. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo na Sub2 (Roraima).....	167
Figura 07. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo na Região 3 (Amazonas e Pará).....	168
Figura 08. Resultados da análise descritiva das distâncias entre os vizinhos mais próximos, por subpopulação amostral	168
Figura 09. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, Sub1	170
Figura 10. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, Região 2	170
Figura 11. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, conjunto das subpopulações do AM e PA.....	171

Capítulo 6

Figura 01. Forma de organização dos dados e representação matemática das estatísticas de concordância para resultados dicotômicos, considerando dois avaliadores ou testes e duas categorias de classificação	185
Figura 02. Representação esquemática do delineamento amostral do estudo	187
Figura 03. Histogramas referentes aos percentuais de inibição (PIn) do ELISA 3ABC, segundo laboratório e teste realizado.....	188
Figura 04. <i>Box plots</i> referentes aos percentuais de inibição (PIn) do ELISA 3ABC, segundo laboratório e teste realizado.....	188
Figura 05. Gráfico de dispersão para os resultados de PIn obtidos no Lab1, referentes ao Teste 1 e Teste 2 (a) e referentes à diferença e a média entre Teste 1 e Teste 2 (b). No gráfico (a) a linha central representa a diagonal de coincidência entre resultados dos Testes 1 e 2.....	189
Figura 06. Gráfico de dispersão para os resultados de PIn obtidos no Lab2, referentes ao Teste 1 e Teste 2 (a) e referentes à diferença e média entre Teste 1 e Teste 2 (b). No gráfico (a) a linha central representa a diagonal de coincidência entre resultados dos Testes 1 e 2.....	190
Figura 07. Representação gráfica das proporções dos totais marginais das tabelas 2x2	191
Figura 08. Resultados de AC_1 , com intervalo de confiança de 95%, segundo laboratórios e grupos de análise.....	192

Capítulo 7

Figura 01. Representação esquemática das coortes com intervenção (C1, C2 e C3) e sem intervenção (CN) ...	205
Figura 02. <i>Box plot</i> para covariável idade, segundo sexo, vacina e coorte	212
Figura 03. Curvas da função de falha $F(t)$ Kaplan-Meier para a coorte CN, cenários 1 e 2.....	215
Figura 04. Matriz com valores-p obtidos frente ao teste exato de Fisher (monocaudal) para diferentes comparações	216
Figura 05. Curvas da função de falha $F(t)$ Kaplan-Meier para a variável número de vacinações, cenários 1 e 2.....	219
Figura 06. Representação gráfica dos valores de $F(t)$ ao final do período de observação, para a variável número de vacinações, segundo cenários 1 e 2	219

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCC: coeficiente de correlação de concordância
CCFA: Campanha Contra à Febre Aftosa
CFL: competição em fase líquida
CK: coeficiente kappa
CN: controle negativo
CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
Código Terrestre: Código Sanitário para os Animais Terrestres
COHEFA: Conferência Hemisférica sobre Erradicação da Febre Aftosa
COSALFA: Comissão Sul-Americana para Luta contra a Febre Aftosa
CVP: Comitê Veterinário Permanente do Cone Sul
DIVA tests: testes para Differentiation of Infected from Vaccinated Animals
EITB: Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA: febre aftosa
FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GTA: Guia de Trânsito Animal
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LEF: líquido esofágico-faríngeo
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OEA: Organização dos Estados Americanos
OIE: Organização Mundial de Saúde
OMC: Organização Mundial do Comércio
PANAFTOSA: Centro Pan-americano de Febre Aftosa
PHEFA: Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa
PIn: porcentagem de inibição
PNEs: proteínas não-estruturais
PNCFA: Plano de Controle e Erradicação da Febre Aftosa
PNEFA: Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa
PPM: Pesquisa da Pecuária Municipal
RIMSA: Reunião Interamericana a Nível Ministerial de Saúde Animal
RT-PCR: cadeia da polimerase de transcrição inversa, em tempo real
SINEAGRO: Sistema Nacional de Emergências Agropecuárias
SINPDEC: Sistema Nacional de Proteção e Defesa Civil
UPA: unidade primária de amostragem
VIAA-IDG: imunodifusão em ágar-gel para detecção de antígeno associado à infecção viral

SUMÁRIO

Capítulo 1

A FEBRE AFTOSA NO BRASIL: SÍNTESE SOBRE AS PRINCIPAIS ATIVIDADES E FASES DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA DOENÇA E SOBRE OS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS CONDUZIDOS NO PAÍS	25
Resumo	25
Introdução	26
Síntese histórica	27
Estudos epidemiológicos sobre a febre aftosa.....	50
Condição zoossanitária para febre aftosa no Brasil, em 2018.....	63
Referências.....	68

Capítulo 2

OS CIRCUITOS PECUÁRIOS E A FEBRE AFTOSA NO BRASIL: UMA ANÁLISE HISTÓRICO-INSTITUCIONAL.....	75
Resumo	75
Introdução	76
Febre aftosa: importância econômica e trajetória institucional no Brasil.....	77
Avanços institucionais no controle da febre aftosa pós 1960.....	79
A importância do amparo institucional no controle da febre aftosa.....	85
Referências.....	86

Capítulo 3

ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO ANIMAL E CARACTERIZAÇÃO DE RISCO EM ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM ÁREAS COM VACINAÇÃO: O CASO DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL, 2013	89
Resumo	89
Introdução	90
Material e métodos.....	92
<i>Área geográfica envolvida</i>	92
<i>Estratégia e metodologia utilizadas</i>	93
Configuração do espaço de investigação (primeira fase do delineamento).....	94
Banco de dados de movimentação animal	95
Estratégia para avaliação de transmissão viral (segunda fase do delineamento).....	96
a) Fatores de risco considerados	96
b) Eleição e alocação das unidades primárias de amostragem (UPAs).....	97
c) Prevalência intra rebanho.....	99
d) Testes laboratoriais utilizados.....	100
e) Estratégia para avaliação de transmissão viral.....	100
Resultados.....	103
<i>Configuração do espaço amostral</i>	103
<i>Descrição da amostra obtida</i>	104
<i>Atividades de vigilância clínica</i>	105
<i>Resultado dos testes laboratoriais para avaliação de anticorpos contra PNC</i>	106
<i>Investigação complementar e introdução de animais sentinelas</i>	107
<i>Análise espacial</i>	108
Discussão	109
Agradecimentos	112
Referências.....	112

Capítulo 4

AValiação de Transmissão Viral em Zona Livre de Febre Aftosa com Vacinação, Brasil, 2014/2015	119
Resumo	119
Introdução	120
Material e métodos	121
<i>Época do estudo e área geográfica envolvida</i>	121
<i>Metodologia</i>	123
Configuração do espaço de investigação (definição das subpopulações amostrais)	123
Fatores de risco considerados	124
Estratégia para avaliação de transmissão viral	125
Análise da distribuição espacial dos rebanhos investigados	129
Estimativa dos custos diretos para realização dos estudos	130
Resultados	131
<i>Identificação das subpopulações amostrais</i>	131
<i>Descrição da amostra obtida</i>	132
<i>Atividades de vigilância clínica</i>	134
<i>Resultados dos testes laboratoriais para avaliação de anticorpos contra PNEs</i>	135
<i>Análise espacial dos resultados obtidos na primeira coleta</i>	137
<i>Estimativa dos custos gerais do estudo</i>	140
Discussão	141
Agradecimentos	146
Referências	146

Capítulo 5

AValiação de Transmissão do Vírus da Febre Aftosa em Estados da Região Amazônica do Brasil, 2014/2015	151
Resumo	151
Introdução	152
Material e métodos	153
<i>Área geográfica envolvida</i>	153
<i>Metodologia</i>	156
Resultados e discussão	161
<i>Período de realização das atividades de campo</i>	161
<i>Características e informações gerais sobre a amostragem realizada</i>	162
<i>Atividades de vigilância clínica</i>	163
<i>Análise dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs</i>	163
Considerações finais	172
Agradecimentos	174
Referências	174

Capítulo 6

ESTUDO DE REPETIBILIDADE DE TESTE ELISA 3ABC EM LABORATÓRIOS DA REDE OFICIAL NO BRASIL	179
Resumo	179
Introdução	180
Material e métodos	181
<i>Características do ensaio analítico avaliado</i>	182
<i>Análise estatística</i>	182
<i>Delineamento amostral</i>	186
Resultados e discussão	187
<i>Análise dos valores PIn</i>	187
<i>Análise dos resultados discretos (positivos e negativos)</i>	190
Considerações finais	193
Bibliografia	194

Capítulo 7

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAS DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA INDUZIDOS PELA VACINAÇÃO: EXPERIMENTO A CAMPO CONDUZIDO EM ZONA LIVRE DE FEBRE AFTOSA COM VACINAÇÃO DO BRASIL, 2009 A 2011	199
Resumo	199
Introdução	200
Material e métodos	203
<i>Considerações gerais sobre o delineamento</i>	203
<i>Vacinas utilizadas</i>	206
<i>Propriedades rurais</i>	206
<i>Aleatorização, confidencialidade, controle das informações e processamento cego das amostras</i>	206
<i>Soros controle positivo</i>	207
<i>Pareamento de Sangrias</i>	208
<i>Testes laboratoriais</i>	208
<i>Coordenação</i>	209
<i>Análise dos resultados</i>	209
Resultados e discussão	211
<i>Informações gerais</i>	211
<i>Coorte CN</i>	215
<i>Análise das vacinas utilizadas</i>	215
<i>Análise segundo número de vacinações e tempo após última vacinação</i>	218
Considerações finais	220
Agradecimentos	221
Referências	222
Anexos	226

Capítulo 1

A FEBRE AFTOSA NO BRASIL: SÍNTESE SOBRE AS PRINCIPAIS ATIVIDADES E FASES DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA DOENÇA E SOBRE OS ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS CONDUZIDOS NO PAÍS

Resumo

Neste trabalho, desenvolve-se uma abordagem histórica sobre a atuação contra a febre aftosa no Brasil, a partir dos seus primeiros registros até o reconhecimento de todo o território nacional como livre da doença, em 2018. Inicialmente, a abordagem está disponibilizada de três formas complementares: uma linha do tempo, com destaque para as principais fases e acontecimentos verificados durante o processo de intervenção no país, incluindo o marco institucional de luta contra a doença, representado pela I Conferência Nacional de Febre Aftosa, ocorrida em 1950, e a transição do objetivo de controle para o de erradicação, em 1983; uma série temporal de focos da doença, confrontada com percentuais de animais vacinados e volume de carne bovina e suína exportada pelo país; e uma visão geográfica e temporal de ocorrência da doença na América do Sul, elaborada a partir do sistema de informação para doenças vesiculares implantado no Continente a partir de meados da década de 1970, baseado nos registros semanais da doença por meio dos quadrantes epidemiológicos. Na sequência, a abordagem histórica destaca os principais estudos epidemiológicos conduzidos no país, com ênfase para os trabalhos realizados a partir do final da década de 1990, com finalidade principal de apoiar a implantação de zonas livres de febre aftosa. Por fim, é apresentado um resumo sobre a evolução geográfica e temporal da implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil e destacada a condição sanitária para a doença na América do Sul, em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE.

Palavras-chave: histórico, transmissão viral, zonas livres, circuitos pecuários, PNEFA

Introdução

Na maior parte dos países da América do Sul, incluindo o Brasil, o sistema de defesa sanitária animal foi concebido e estruturado com enfoque no controle e na erradicação da febre aftosa. A importância dessa relação foi expressa por Rosenberg e Goic (1973) com a seguinte ênfase: *“Os programas nacionais de luta contra a febre aftosa na América do Sul não constituem somente um procedimento técnico para controlar uma doença em particular. Ao contrário, determinam um compromisso em escala continental para a maior produção de proteína animal e para o desenvolvimento social da América Latina, onde ainda existem vastíssimos setores que sofrem hipocalimentação proteica. Em outras palavras, seus objetivos relacionam-se diretamente com o bem-estar da sociedade como um todo”* (p.19, tradução livre). Astudillo (1992), por sua vez, ao descrever os avanços no controle da doença na América do Sul até o final da década de oitenta, destaca que a febre aftosa se revelou, ao mesmo tempo, um problema e uma oportunidade. Problema, porque sua presença não permitia aos países aproveitarem das vantagens naturais da região para produção pecuária, limitando a produtividade dos rebanhos e o acesso a mercados consumidores. Oportunidade, porque, segundo o autor, *“...a mobilização dos recursos utilizados no seu combate permitiu estruturar uma rede de serviços de saúde animal que contribuiu para diminuir o atraso relativo da pecuária latino-americana em relação aos países mais desenvolvidos. Permitiu além disso a racionalização e a sistematização das atividades sanitárias”* (ASTUDILLO, 1992, p.22). O autor reforça que a atuação contra a febre aftosa foi importante estímulo para o desenvolvimento de novos conceitos sobre epidemiologia veterinária, passando a considerar a sociedade, englobando a organização econômica e produtiva da pecuária, como fonte de explicação e de solução para problemas em saúde animal. Propiciou, ainda, a participação social em grandes áreas do continente e permitiu a implantação generalizada dos sistemas locais de assistência veterinária. Esta realidade também foi reconhecida por Olascoaga (1982), que descreveu o sistema de informação e de vigilância epidemiológica das doenças vesiculares implantado na América do Sul a partir dos anos setenta, e reforçada por Naranjo e Cosivi (2013), quando discutem os avanços e dificuldades na erradicação da doença no Continente Sul Americano até o início da década de 2010, bem como os desafios da região para os anos seguintes.

Para o Brasil, passados quase setenta anos da realização da I Conferência Nacional de Febre Aftosa, ocorrida em 1950 (CONFERÊNCIA..., 1950), ou mais de cinquenta anos da institucionalização da Campanha Contra à Febre Aftosa - CCFA, por meio do Decreto nº 52.344, de 09/08/1963, **o ano de 2018**, apresenta-se como importante marco na luta contra a doença. Durante reunião ocorrida na sede da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE, em fevereiro de 2018, a Comissão Científica para Doença dos Animais, com base em parecer do Grupo *Ad hoc* de Febre Aftosa, manifestou-se favorável ao pleito brasileiro de zona livre da doença, o que, na sequência, foi ratificado pela Assembleia Mundial de Delegados (OIE, 2018). Todo o Brasil passa a ser livre de febre aftosa: cerca de 99% de seu território reconhecido como zona livre com vacinação e o restante 1% como zona livre sem vacinação (Estado de Santa Catarina).

O objetivo deste trabalho é descrever, resumidamente, o histórico da doença no país e uma síntese sobre os principais estudos epidemiológicos realizados para apoiar a gestão dos programas implantados e a certificação de ausência de transmissão viral nos pleitos de zonas livres da doença. O texto é encerrado com uma descrição da condição da febre aftosa na América do Sul e no país, a partir do reconhecimento internacional em 2018.

Síntese histórica

De forma resumida, e buscando uma visão integrada sobre a atuação contra a febre aftosa no Brasil, na sequência é apresentada uma linha do tempo construída a partir dos registros da introdução da doença no país, com destaque para os principais momentos que marcaram as fases de controle e erradicação, até a década atual. A sequência histórica proposta está esquematizada na Figura 1, onde a parte superior destaca fatos internos e próprios do Brasil, enquanto na parte inferior são apontados temas mais relacionados ao contexto internacional que também exerceram influência sobre as ações conduzidas no país. Abordagens mais detalhadas e complementares sobre a história da febre aftosa, com ênfase no Brasil e na América do Sul, estão disponíveis em Rosenberg e Goic (1973), Olascoaga (1982, 2003), Astudillo (1992), Torres e Inzaurrealde (1998), Olascoaga et al. (1999), Serrão (1999), Melo et al. (2002), Lyra (2003), Melo (2003), Sutmoller et al. (2003), Lyra e Silva (2004), Souza et al. (2008), Irrazábal (2012) e Naranjo e Cosivi (2013).

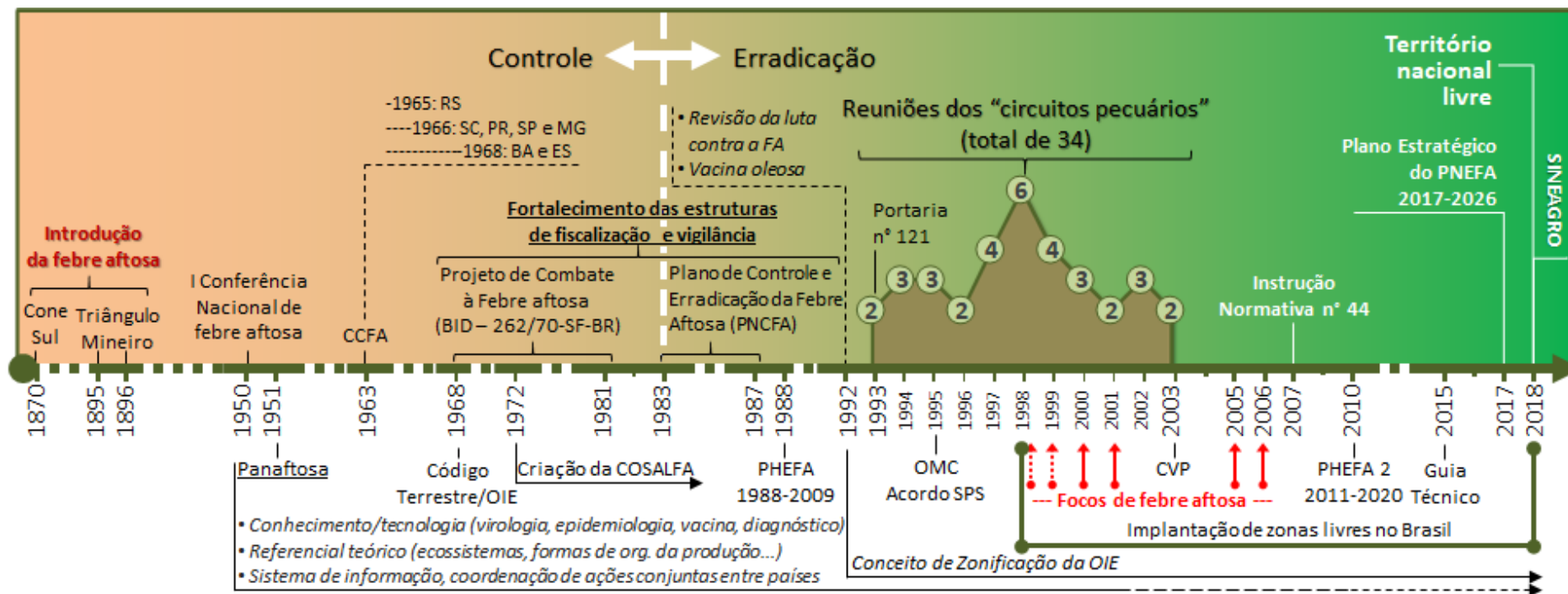


Figura 01. Evolução histórica de ações e fatos relacionados ao controle e à erradicação da febre aftosa no Brasil

Apesar da dificuldade de precisar a primeira ocorrência da doença na América do Sul, a evolução histórica proposta inicia-se em 1870, ano em que, segundo Olascoaga et al. (1999), estão disponíveis os primeiros registros documentados da doença no continente americano. Estes autores mencionam que, no ano em questão, os focos foram registrados, quase simultaneamente, nos Estados Unidos, Argentina e Uruguai, associados às primeiras importações de bovinos da Europa, onde a doença ocorria de forma endêmica. Astudillo (1992), por sua vez, informa que os primeiros focos foram reconhecidos próximos a Buenos Aires, Argentina, nos anos de 1865 e 1866, informação também apresentada por Olascoaga (2003). Ainda segundo Astudillo (1992), em 1871, “a revista britânica *The Veterinarian*’ descreve a presença da enfermidade no Uruguai, Buenos Aires e em todas as províncias agrícolas do Chile, ao norte de Bio-Bio” (p. 16). No caso do Brasil, provavelmente, os surtos registrados em 1870 no Cone Sul tenham atingido a Região Sul do país, hipótese também considerada por Olascoaga (2003) e por Rosenberg e Goic (1973), entretanto, o primeiro reconhecimento oficial da doença foi datado de 1895, conforme publicado no número especial do Boletim de Defesa Sanitária Animal, intitulado “As doenças dos animais no Brasil, Histórico das primeiras observações” (BRASIL, 1988)¹. No ano seguinte, novos surtos da doença foram descritos simultaneamente no Triângulo Mineiro e no Rio Grande do Sul (CONFERÊNCIA..., 1950). A partir daqueles anos, a febre aftosa se espalhou para as demais regiões do país, tendo em vista as características epidemiológicas da doença e o processo de ocupação e expansão do território nacional, nominado por Figueiredo (1994) como “Colonização pela pata do boi”, uma vez que a pecuária bovina sempre foi ferramenta chave de colonização do “Novo Continente”.

Após os primeiros registros da febre aftosa, passaram-se várias décadas até ser iniciada a intervenção institucionalizada para seu controle no Brasil. O marco inicial considerado nesta linha do tempo, como ação estruturada e coletiva de intervenção, foi a I Conferência Nacional de Febre Aftosa, realizada no Rio de Janeiro, no período de 5 a 11 de setembro de 1950 (CONFERÊNCIA..., 1950), reunindo autoridades sanitárias, pesquisadores e acadêmicos, que promoveram ampla e rica discussão sobre a realidade da doença no país, e apresentaram recomendações de estratégias iniciais de atuação.

Anteriormente a 1950, deve-se registrar alguns fatos adicionais no âmbito nacional, que, apesar de relevantes, tiveram reduzido impacto direto no controle da febre aftosa no país: i) 1910, criação do serviço de veterinária, no então Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio (Decreto nº 8331, de 31/10/1910); ii) 1934, publicação do regulamento do Serviço

¹ Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-nimal/sistema-informacao-saude-animal>

de Defesa Sanitária Animal (Decreto nº 24548, de 3/7/1934), contendo medidas de profilaxia para a febre aftosa; iii) 1938, aprovação do *Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e de Estabelecimentos que os Fabriquem*; e iv) 1941, definição de métodos para desinfecção de todo meio de transporte e locais de embarque e desembarque de animais.

No contexto internacional, destaca-se a criação, em 1924, do Escritório Internacional de Epizootias, atual Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, com sua primeira sessão geral realizada em 1927; a erradicação da febre aftosa nos EUA, em 1929; e o relato do professor Otto Waldmann, diretor do Laboratório da Ilha de Riems, Alemanha, em 1938, durante o XIII Congresso Internacional de Veterinária, do preparo da vacina de Riems contra a febre aftosa. A descoberta da vacina trouxe novas perspectivas de controle da doença, entretanto, sua composição inicial revelou-se pouco prática para as condições de criação na América do Sul, por envolver doses para bovinos variando de 15 a 60 ml, de acordo com o peso do animal, com produção de nódulo local grande e doloroso. Destaca-se, ainda, que atendendo convite do governo argentino, a equipe do professor Waldmann transferiu-se para aquele país a partir de 1947, dedicando-se especificamente aos trabalhos de controle da febre aftosa (CONFERÊNCIA..., 1950). No Brasil, no biênio 1942-1943, o professor Sylvio Torres, pesquisador no Rio Grande do Sul, propôs uma composição modificada da vacina de Waldmann, reduzindo a dose para 5 ml, de forma a facilitar sua conservação e aplicação nas condições brasileiras. Este trabalho foi aprovado e premiado em 1943, no II Congresso Brasileiro de Veterinária, realizado em Belo Horizonte. No ano seguinte, o governo do Rio Grande do Sul fundou o Instituto Anti-Aftoso e o Laboratório de Emergência, que passou a se dedicar, principalmente, à produção de vacina contra a doença (CONFERÊNCIA..., 1950).

Em 1947, em atenção à solicitação do Ministério da Agricultura para realização da *I Conferência Nacional sobre Febre Aftosa*, foi aberto no Congresso Nacional o Projeto nº 188 (16/05/1947) para discussão da matéria. Após várias reuniões e sessões plenárias, com amplos debates que resultaram em manifestações favoráveis das Comissões de Constituição e Justiça, de Agricultura e de Finanças do Congresso Nacional, o Presidente da República, Eurico Gaspar Dutra, por meio da Lei nº 493, de 19/11/1948, autorizou a abertura, no Ministério da Agricultura, de crédito especial para realização da Conferência, o que foi concretizado por meio do Decreto nº 26.343, de 10/09/1949.

Como se observa, para realização da *I Conferência Nacional de Febre Aftosa* ocorreu, por mais de três anos, amplo debate político no país e forte empenho de profissionais da medicina veterinária, atuantes nos setores público e acadêmico. Assim, esta Conferência pode ser considerada como primeiro marco institucional para intervenção organizada contra a doença no Brasil.

É importante destacar que os registros das palestras e discussões ocorridas durante a Conferência evidenciam, desde aquela época, a motivação e preocupação com os mercados internacionais, como pode ser observado em trechos extraídos da mensagem inicial dos Anais da Conferência, transcritos abaixo, que se mostram atuais e, de certa forma, sintetizam os argumentos principais que impulsionam a atuação contra a doença no país:

“A febre aftosa sempre constituiu um dos mais sérios problemas a entravar a economia pecuária do país e agora, mais do que nunca, vão se agravando suas consequências, exatamente à medida que se multiplicam as facilidades de *inter-comunicação* entre os povos, se intensificam e se estreitam suas relações comerciais.

Mesmo que não *levamos* em conta os altos *interesses* do país, que estão a exigir uma campanha metódica, pertinaz, intensa e continuada contra essa doença depauperadora da economia brasileira em centenas de milhões de cruzeiros anuais, aí estão os *interesses* internacionais a nos obrigar a uma decisão rápida, deflagrando-se quanto antes, um combate sério, decidido e decisivo, *sinão* para erradicar a virose, pelo menos para mantê-la sob estreito *contrôle*, protegendo-se sobretudo as grandes regiões criadoras.

Não podemos viver isolados no mundo; ao contrário, nossas relações com os demais povos devem ser cada vez mais entrelaçadas, mais fáceis, mais estreitamente ligadas por *interesses* comuns. Entretanto, a existência da febre aftosa entre nós, cria situações desairosas para o Brasil, estabelecendo barreiras à exportação de produtos de origem animal para muitos estados livres desta virose e levantando dificuldades ao comércio internacional de outros produtos ligados à produção animal ou que possam, por qualquer modo, veicular o vírus aftoso. E no conceito das demais nações, o Brasil continua sendo um país infectado pela febre aftosa, vale dizer, um país ao qual se fazem restrições diversas que melindram nosso sentimento patriótico, embora as reconheçamos tecnicamente certas e comercialmente necessárias.

O problema da febre aftosa tem tal relevância para o próprio país infectado e tal significação internacional, que são numerosos os que tudo envidam, com verdadeiros sacrifícios, para erradicar a doença de seu território”. [...] (CONFERÊNCIA..., 1950, Introdução, p. 5, grifos nossos)

Entre os profissionais que participaram da Conferência, destaca-se a atuação do professor Sylvio Torres, responsável pela palestra de abertura, da qual são resgatados os trechos abaixo com objetivo de resumir os sentimentos predominantes à época e de demonstrar o caráter pioneiro conferido ao encontro, proposto como ponto inicial para luta organizada contra a febre aftosa no Brasil:

“[...]. Hoje se iniciam os trabalhos da I Conferência Nacional de Febre Aftosa, para traçarmos as linhas mestras de um programa de trabalho em nosso país, tendentes a controlar (porque erradicar, tão cedo não acredito) a febre aftosa, a sua disseminação e, assim, irmos paulatinamente diminuindo os prejuízos que todos os anos sofre a pecuária brasileira.

Disse que não acredito na erradicação por enquanto; talvez somente depois de uma dezena de anos possamos pensar nisso, porquanto, a situação econômica atual do nosso país não permite, como também não o permitem nossas condições geográficas, uma campanha de tão larga envergadura. Com países empobrecidos limitando as nossas fronteiras não poderemos esperar repetir o que o Governo mexicano, com a ajuda do Governo americano, está fazendo no México. Contudo, nossas esperanças são grandes e não devemos capitular.

[]

Espero poder ver um dia a febre aftosa extinta e as carnes congeladas do Brasil com entrada livre nos países que hoje as recusam.

[]

Aqui comparecemos com o propósito de trabalhar. E se não pudermos ver em vida aquilo que almejamos, pelo menos que nos seja dado morrer confiantes em que as gerações futuras hão de constatar, que seus antepassados abriram o caminho para dar ao nosso país os recursos de que necessita, para ser na realidade o país do futuro” (CONFERÊNCIA..., 1950, p. 95)

Durante a Conferência, como principais pontos de estrangulamento para as atividades de controle da doença no Brasil foram destacados: níveis cultural e de compreensão das populações rurais, ainda não bem desenvolvidos; deficiência numérica de veterinários; questões geográficas do país, levando a problemas de comunicação e de distribuição e conservação da vacina; prazos entre etapas de vacinação; organização da campanha de vacinação; e material para preparo da vacina. Este último ponto, devido a sua complexidade e por ser uma questão identificada como primordial para o controle da doença no país, demandou intensos debates durante a Conferência. Para compreender a dimensão do problema vivido na época, cabe esclarecer que, inicialmente, as vacinas eram produzidas a partir de epitélios de animais inoculados em matadouros, o que gerava grandes dificuldades, como pode ser observado na fala do professor Sylvio Torres durante a Conferência:

“De problema, em problema, chegamos ao que se relaciona com o preparo da vacina, básico para qualquer programa. Se quisermos a vacina, precisamos de epitélio virulento em condições adequadas.

Já se ouve falar em cultura do vírus aftoso, mas nós ainda não o podemos cultivar. Como a imprensa tem divulgado que o Brasil precisa de 60 milhões de *dóses* de vacina, anualmente, far-se-á necessário inocular em massa, porque é esta a única maneira de conseguir epitélio virulento, no momento atual.

Vamos argumentar como se fôssemos preparar Vacina trivalente. *Alguem* já calculou, o que representa em esforço, em recursos e em epitélio virulento uma tal quantidade de vacina?

De *acôrdo* com a nossa experiência, serão necessárias pelo menos 21 toneladas de epitélio, sendo sete toneladas de cada tipo de vírus. Ora, como cada bovino inoculado dá, em média 25 gramas de epitélio, para obter aquela quantidade de antígeno, será necessário inocular 840.000 animais.

Ocorre, porém que *cêrca* de 45% de bovinos inoculados não reagem; o que eleva o número de animais a serem inoculados a 1.118.000 cabeças.

[]

Quando se trata de produção de epitélio, outro grave problema surge naturalmente: a resistência que se encontra no aproveitamento para consumo, de animais que tenham sido inoculados. Já encontramos essa dificuldade em *Pôrto Alegre*, no início de nossos trabalhos, e acredito que em outras cidades do Brasil o mesmo problema se apresenta” (CONFERÊNCIA..., 1950, p. 103, grifos nossos)

Como resultado da *I Conferência Nacional de Febre Aftosa* foram recomendadas as seguintes providências e diretrizes para a campanha contra a febre aftosa no país: i) criação de uma Comissão Executiva Central; ii) organização de Comissões Executivas Estaduais; e iii) definição das bases essenciais para campanha contra à febre aftosa fundamentadas na produção de vacina e soro em larga escala; aplicação de medidas rigorosas de defesa sanitária animal; investigação e aperfeiçoamento técnicos; documentação e divulgação; e recursos financeiros. Destaca-se que mencionada produção de soro, utilizado para recuperação de animais doentes, foi uma prática abandonada nas estratégias de luta contra a doença no país, não existindo dados ou registros oficiais sobre sua utilização.

No ano seguinte, 1951, como consequência da referida Conferência, foi iniciado um programa nacional de controle da febre aftosa que não obteve resultados satisfatórios devido à carência de recursos financeiros, técnicos e humanos (BRASIL, 1983). Apesar desta primeira iniciativa malsucedida, as definições acordadas durante a *I Conferência Nacional de Febre Aftosa* foram base para instituição da CCFA em 1963, considerada, por muitos, como primeiro marco institucional de luta contra a doença no país. No Brasil, conforme apontado na Figura 1, a CCFA foi implantada no estado do Rio Grande do Sul, a partir de 1965; nos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, a partir de 1966; e nos estados da Bahia e Espírito Santo, a partir de 1968. Naquela época, as atividades resumiam-se, basicamente, na atuação em focos e na vacinação contra a febre aftosa.

No âmbito internacional, conforme destacado na Figura 1, em 1951 ocorre a instalação no Brasil, em Duque de Caxias, RJ, do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - PANAFOTSA, fruto de convênio celebrado entre o governo brasileiro e a Repartição Sanitária Pan-Americana (*Oficina Sanitaria Panamericana e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*), contando com apoio financeiro do programa de Cooperação Técnica da Organização dos Estados Americanos - OEA. O PANAFOTSA trouxe para a região direcionamento técnico e articulação internacional, elementos decisivos para evolução na luta contra a febre aftosa na América do Sul. Segundo Rosenberg e Goic (1973), entre os objetivos do PANAFOTSA destacam-se: o desenvolvimento da infraestrutura dos serviços de prevenção; a assessoria técnica direta; o treinamento das equipes técnicas; e o papel de laboratório de referência para as Américas no diagnóstico de febre aftosa e de outras doenças vesiculares dos animais. No esquema apresentado na Figura 1, a linha representa a participação contínua do PANAFOTSA no período considerado, passando de sólida a pontilhada no decorrer do tempo, com objetivo de caracterizar a redução de sua influência ao longo dos anos, no que diz respeito à febre aftosa. São inúmeros os exemplos de conteúdo técnico gerado a partir de pesquisas e trabalhos conduzidos pelo PANAFOTSA em diferentes áreas do conhecimento como virologia, epidemiologia, imunologia, diagnóstico, sistema de informação, gestão de programas

zoossanitários, entre outras. Parte da contribuição do PANAFTOSA, particularmente nas áreas de diagnóstico e de produção de vacina, foram descritos por Astudillo et al. (1993). Contribuições na área de sistemas de informação são apresentadas por Astudillo (1982), Astudillo e Deppermann (1980) e Olascoaga (1982), e na área de epidemiologia da febre aftosa destacam-se os trabalhos de Obiaga et al. (1979) e Rosenberg (1975, 1977). A relação de publicações científicas, manuais, boletins e informes técnicos relativos à febre aftosa e outras zoonoses é mantida atualizada pelo Centro de Gestão do Conhecimento do PANAFTOSA por meio do Catálogo de Publicações² (PANAFTOSA, 2017a). Além da produção de conhecimento sobre a doença e sobre a gestão dos programas zoossanitários, destaca-se o papel fundamental do PANAFTOSA na interlocução entre os países do Continente Americano nos principais fóruns de debate sobre a doença, com especial atenção para sua atuação como Secretaria *Ex Officio* junto à Comissão Sul-Americana para Luta contra a Febre Aftosa - COSALFA.

Ainda no contexto internacional, destacam-se, nos anos seguintes, a erradicação da febre aftosa no Canadá, em 1952, e no México, em 1953, e as restrições comerciais impostas pelos Estados Unidos, a partir de 1959, para produtos oriundos de países com ocorrência da doença (OLASCOAGA et al., 1999; ROSENBERG e GOIC, 1973). Segundo estes autores, as restrições levantadas pelos Estados Unidos foram decisivas para impulsionar a implantação de programas nacionais de luta contra a febre aftosa em países com potencial para exportação de produtos pecuários, como o caso da maior parte da América do Sul. A implantação destes programas iniciou-se na Argentina em 1960, e prosseguiu com o Brasil em 1963 (considerando a instituição da CCFA, conforme descrito acima), Paraguai e Uruguai em 1968, Chile em 1970 e Colômbia em 1972. Registra-se que, mesmo de forma incompleta, Venezuela e Peru desenvolveram iniciativas nacionais na luta contra a doença a partir de 1956 e 1964, respectivamente (ROSENBERG e GOIC, 1973).

Em 1968, houve a publicação da primeira versão do atual Código Sanitário para os Animais Terrestres da OIE – Código Terrestre, fato incluído na linha de tempo apresentada. Por fundamentar-se em bases científicas e representar entendimentos entre os países membros da OIE, o Código Terrestre mostra-se bastante dinâmico, e sua evolução faz parte da rica história da defesa sanitária animal. Seu conteúdo e detalhamento evoluiu fortemente nos anos seguintes, sendo que até sua sétima edição, em 1998, as atualizações ocorriam, em média, a cada cinco anos. A partir de 1998, com a intensificação do intercâmbio comercial entre países e como consequência da OIE ter sido reconhecida, em 1995, como órgão de assessoramento para a Organização Mundial do Comércio – OMC, o que também está destacado na Figura 1, o Código passou a ser reeditado a cada ano, chegando-se a sua 27ª edição em 2018.

² Disponível em <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34301>

O Código Terrestre, como mencionado, representa fruto de entendimento entre autoridades veterinárias dos países membros da OIE, o que lhe confere importante valor como referência para padrões e critérios a serem considerados no intercâmbio mundial de animais e de seus produtos e subprodutos. Como exemplo de temas tratados no Código Terrestre, destacam-se o conceito de zonificação e as orientações gerais sobre sistemas de vigilância, itens de fundamental importância para o intercâmbio de animais, e de seus produtos e subprodutos, e para avanço dos programas de erradicação da febre aftosa nos países sul-americanos. O reconhecimento internacional de país ou zona livre de doenças dos animais, assim como os critérios para certificação e demonstração da condição zoossanitária de livre, seguem diretrizes da OIE, inseridas e organizadas no Código Terrestre.

Seguindo na linha de tempo proposta, diante da necessidade de melhorar a articulação entre os países da América do Sul na luta contra a febre aftosa, em 1972 foi criada a COSALFA, com o propósito de avaliar o andamento dos programas nacionais de controle e erradicação da doença. A Comissão busca garantir a integração regional das ações de intervenção, com objetivos específicos de coordenação, promoção e avaliação regional, harmonização de normas sanitárias e promoção de convênios bilaterais ou multilaterais para o controle da febre aftosa (COMISIÓN..., 2010). A primeira reunião ocorreu em 1973, no Rio de Janeiro, e sua 45ª edição foi realizada na cidade de Santa Cruz de la Sierra, Bolívia, no período de 19 a 20 de abril de 2018. O fórum, como informado, tem o PANAFTOSA na função de Secretaria *Ex Officio* e, desde 2014 (41ª edição), está constituído por 13 países do Continente Americano: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, Guiana, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela. Cada país é representado pelo diretor do serviço veterinário oficial e, a partir da 23ª edição, em 1996, também por um representante do setor privado, indicado pela mais alta entidade gremial dos produtores pecuários que, no caso do Brasil, está representada pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil - CNA. As reuniões ordinárias são realizadas no primeiro semestre de cada ano, em data anterior à Assembleia Mundial de delegados da OIE. Diante de demandas específicas, são convocadas reuniões extraordinárias, a qualquer momento. Até o ano de 2017 foram realizadas seis reuniões extraordinárias, a última em 21 de julho de 2017, no Distrito Federal, Brasil, com objetivo de avaliar a reintrodução da febre aftosa na Colômbia e suas consequências para o Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa - PHEFA.

No âmbito interno, os esforços realizados com a CCFA não foram suficientes para o controle efetivo nas áreas onde a doença ocorria de forma endêmica e não evitaram sua difusão para os estados onde a criação de bovinos vinha recebendo incentivos para desenvolvimento, como o caso das regiões Norte e Centro-Oeste do país (BRASIL, 1983). As atividades de

vacinação ficaram limitadas a poucos estados e os recursos financeiros foram insuficientes para ampliação das ações de controle, o que levou o governo brasileiro a buscar apoio externo. Desta forma, em 1968, o Ministério da Agricultura obteve do Banco Interamericano de Desenvolvimento o empréstimo de 13 milhões de dólares (contrapartida nacional de 54 milhões de dólares) para financiar o Projeto de Combate à Febre Aftosa em quatro etapas a serem implementadas em 16 anos, com objetivo de controle da doença (BRASIL, 1968). Entretanto, segundo Brasil (1983), por insuficiência de dados primários, as ações desenvolvidas dentro do Projeto de Combate à Febre Aftosa desconsideraram as diferentes caracterizações epidemiológicas da doença, e as políticas adotadas foram uniformes, não levando em conta a diversidade de ecossistemas que o país apresentava. A falta de continuidade na aplicação de recursos e a ausência de uma clara definição estratégica e administrativa de atuação, não permitiram a conclusão das etapas previstas, acarretando o ressurgimento da doença, com nova intensidade, nas áreas onde o trabalho de controle tinha sido interrompido (BRASIL, 1983).

Apesar das dificuldades registradas nas ações de controle da doença, observou-se, no início da década de 1980, uma redução expressiva no total de focos registrados no país (MINISTÉRIO..., 1950-1998), e o trabalho realizado também permitiu obter melhor conhecimento dos fatores determinantes da ocorrência da doença (BRASIL, 1983). Naquela época, destaca-se a erradicação da doença no Chile, em 1981 (OLASCOAGA et al., 1999), fato motivador para os demais países sul-americanos. Esta realidade, associada com o conhecimento adquirido sobre a epidemiologia da doença na América do Sul, com os avanços obtidos na qualidade e produção da vacina contra a febre aftosa, com o fortalecimento das estruturas dos serviços veterinários e com a expectativa de ampliação do mercado exportador, incentivou o governo brasileiro a propor a segunda etapa de luta contra a doença, denominada de “Plano de Controle e **Erradicação** da Febre Aftosa – PNCFA”, com metas estabelecidas para o período de 1983 a 1987. O detalhamento de todo o Plano está disponível em Brasil (1983), cujos objetivo geral e estratégia de controle e erradicação seguem transcritos abaixo:

“O propósito desta segunda etapa do Plano Nacional de Controle e **Erradicação** da febre aftosa consiste em eliminar os efeitos da doença, como fator de interferência na produtividade pecuária e no comércio exterior de carnes, leite e outros produtos e subprodutos de origem animal. A longo prazo, este objetivo somente será logrado por meio da **erradicação** da doença do território nacional.

Ao contrário das estratégias sanitárias tradicionais, que procuram a diminuição uniforme da incidência da doença em todo o país, este projeto apresenta uma metodologia tendente à redução progressiva, até atingir a eliminação completa da doença, a nível de áreas específicas. Para tanto, podem ser necessárias ações rígidas à distância, isto é, nas áreas de origem dos problemas.

A conquista de áreas indenes da doença serve, então, como centro de irradiação política de **erradicação**, chegando-se ao desenvolvimento de vastas regiões livres de febre aftosa, até atingir, em etapas futuras, todo o território nacional.

A seleção de áreas e de estratégias específicas para cada uma delas, baseia-se na caracterização ecológica-produtora das modalidades de ocorrência da doença (ecossistemas), conforme análise em capítulos anteriores.

A agrupação dos ecossistemas em grandes *regiões estratégicas*, tal como definido anteriormente, baseia-se na característica regional relativamente autônoma da pecuária nacional.

Assim, é que, para cada uma das regiões são estabelecidas metas específicas nesta segunda etapa de cinco anos, com estratégias correspondentes a cada um dos ecossistemas nelas incluídos” (BRASIL, 1983, p. 41, grifos nossos)

Em síntese, foi prevista a ausência de casos clínicos nos estados do Sul do país nos cinco anos seguintes à implantação do Plano, e o controle efetivo nas demais regiões, para posterior erradicação, além de propiciar a conquista e manutenção de áreas livres da doença (BRASIL, 1983). O enfoque do programa foi a erradicação da febre aftosa, a curto e médio prazos, envolvendo a comunidade e buscando transformar a mentalidade de convivência passiva em conscientização da necessidade urgente de eliminá-la do território nacional. Para isso, o país, em termos operacionais e considerando os sistemas de produção pecuária e os ecossistemas distintos da doença, foi dividido em seis grandes regiões, com diretrizes e metas específicas, tema que será retomado mais à frente neste documento. Mostrou-se necessária uma estratégia de intervenção que possibilitasse acelerar o controle da doença e evitar o aumento do risco envolvido nos projetos de desenvolvimento pecuário, e, que ao mesmo tempo, permitisse estabelecer as condições para, em etapas sucessivas, atingir o objetivo da eliminação da febre aftosa do território nacional. Portanto, 1983, conforme destacado na Figura 1, é considerado marco na evolução do objetivo de controle para o de erradicação da febre aftosa no Brasil. Todo o período de 1968 a 1988, que abrange as duas etapas dos programas de intervenção sobre a doença, está caracterizado na linha de tempo, de forma geral, como de fortalecimento das estruturas de fiscalização e de vigilância do sistema nacional de defesa sanitária animal.

Até o final da década de 1980, o objetivo de erradicação da febre aftosa estendeu-se para todo o Continente Americano. Em 1987, por meio da Resolução XIII da V Reunião Interamericana a Nível Ministerial de Saúde Animal - RIMSA V, foi criada a Conferência Hemisférica sobre **Erradicação** da Febre Aftosa - COHEFA, como fórum de debate das políticas e estratégias de erradicação da doença. A primeira reunião da COHEFA foi realizada em Washington, DC, EUA, em 1988, ocasião em que foi aprovado o PHEFA, e estabelecido o Plano de Ação 1988 – 2009, com meta de erradicação da febre aftosa até 2009 (ORGANIZACION..., 1988). Conforme destacam Naranjo e Cosivi (2013), o PHEFA foi

concebido prevendo os processos de ajuste econômico que se avizinhavam no final da década de oitenta e foi pioneiro no processo de integração econômica e institucional do continente. Estes autores resumem as bases estratégicas do PHEFA nos seguintes pontos: uso da caracterização epidemiológica da doença com base nos sistemas de produção para priorizar intervenções; esforço conjunto dos setores público e privado; desenvolvimento de iniciativas e planos sub-regionais; e estabelecimento de acordos bilaterais e multilaterais nas sub-regiões. Naranjo e Cosivi (2013) reforçam que a base técnica e epidemiológica do Plano de Ação foi o amplo conhecimento sobre a história natural da doença e seus determinantes, particularmente as implicações dos sistemas de produção de gado para a epidemiologia da doença, além da análise dos processos de saúde-doença feita pela abordagem de ecossistemas desenvolvida pelo PANAFTOSA.

Em 1992, conforme apontado na Figura 1, registram-se dois momentos de fundamental importância e que reforçaram as ações compartilhadas entre setores público e privado para o objetivo de erradicação da febre aftosa na região. No âmbito internacional, em maio do referido ano, a Assembleia Mundial de delegados da OIE aprovou a inserção dos conceitos de zonificação e de regionalização no Código Terrestre, acompanhados dos primeiros procedimentos para reconhecimento internacional de país e zonas livres de febre aftosa (OIE, 1992), o que trouxe maior incentivo para a estratégia gradativa de erradicação da doença preconizada no PHEFA. Neste momento, é importante esclarecer que as definições de zona livre, zona infectada e país livre de febre aftosa estavam presentes no Código Terrestre desde sua primeira edição, em 1968, conforme transcrito abaixo:

“Zona livre: significa uma extensão do território que pode ser claramente definida, onde os animais estão sob controle veterinário oficial e na qual nenhum caso de doença especificada na lista A da OIE tenha sido confirmada por um período definido.

Zona infectada: significa uma extensão do território na qual uma das seguintes doenças na Lista A tem sido observada: febre aftosa, peste bovina, pleuropneumonia contagiosa bovina, varíola ovina, peste suína clássica, peste suína africana, encefalomielite enzoótica suína, peste das aves e doença de Newcastle. A extensão da zona infectada definida pela autoridade veterinária deve considerar a natureza (configuração) da terra, os fatores biológicos e os métodos de criação, e geralmente não deve ser menos do que 10 km do foco em países com métodos intensivos de criação e 50 km em países com métodos extensivos de criação. A duração do período que a zona deve permanecer infectada varia de acordo com as doenças e com os métodos profiláticos utilizados, como indicado no artigo 6” (OIE, 1968, p. 6, tradução livre)

“Para os fins deste código, um país será considerado livre de febre aftosa quando puder ser estabelecido que esta doença não esteve presente nele por pelo menos nos últimos três anos. Este período deverá ser seis meses após o último caso da doença ter sido lidado com êxito por países nos quais uma "política de abate" com ou sem vacinação contra a febre aftosa é praticada” (OIE, 1968, Art. 46, p. 34, tradução livre)

A implantação de zonas livres sempre foi reconhecida como importante estratégia para desenvolvimento da produção pecuária e segurança no intercâmbio internacional de animais e de seus produtos e subprodutos, tema que sofreu contínuas atualizações nas versões seguintes do Código Terrestre. Esta afirmação pode ser constatada por meio do trecho abaixo, transcrito do prólogo da 3ª versão do Código Terrestre, publicada em 1976, com resumos sobre as avaliações conduzidas pelas Comissões Regionais da OIE, referentes ao projeto de Regulamento Zoossanitário Internacional:

“Considerando as Recomendações da primeira Conferência Regional celebrada em Dakar, entre 6 a 9 de dezembro de 1966, registra com satisfação os grandes progressos realizados em vários Países Membros a fim de criar e manter zonas livres de doenças inscritas na Lista A da OIE adotada pela Comissão Permanente do Código Zoossanitário Internacional da OIE.

O estabelecimento de tais zonas deve:

1. Permitir o mais rápido desenvolvimento da produção pecuária;
2. Promover o comércio interior do gado, e
3. Facilitar os intercâmbios de animais e produtos de origem animal entre os países, ao mesmo tempo que se asseguram garantias sanitárias válidas.

Tais zonas deverão ser objeto da vigilância veterinária oficial permanente, efetuada por equipe suficiente e competente com objetivo de obter a confiança dos países importadores” (OIE, 1976, p. 9, tradução livre, grifos nossos)

A demanda acima, apresentada pela Comissão Regional da OIE na África, levou à incorporação ao Código Terrestre, em 1976, da diretriz que permitia países infectados por determinada doença da Lista A, realizarem o intercâmbio internacional a partir de áreas localizadas fora de zonas infectadas.

No Continente Americano, a partir de meados dos anos 1970, a utilização de áreas livres também foi reconhecida como importante estratégia de intervenção contra a febre aftosa. Com base na Recomendação VI da IX Reunião Interamericana, a Nível Ministerial, sobre o controle da febre aftosa e outras zoonoses, ocorrida em 1976, o PANAFTOSA elaborou, com participação dos países sul-americanos, o documento de trabalho “*Países e Áreas Livres de Febre Aftosa. Requisitos e Condições*”, adotado como guia pela IV COSALFA, realizada em 1977 (PANAFTOSA, 1984). Em 1982, foi realizado nas dependências do PANAFTOSA, entre os dias 8 e 10 de março, o Seminário sobre áreas livres de febre aftosa na América do Sul (PAGÉS, 1982) e, neste mesmo ano, na 4ª edição do Código Terrestre, no caso específico da febre aftosa, foi inserido o Art. 2.1.1.2, definindo com maior detalhamento as condições para o estabelecimento de uma zona livre da doença (OIE, 1982). Ainda na América do Sul, com objetivo de apoiar os países na utilização da estratégia de áreas livres e preparar a região para erradicação gradativa da doença, o PANAFTOSA publicou, em 1984, o “*Manual de procedimientos para preservar, ampliar y lograr áreas libres de fiebre aftosa en America del Sur*” (PANAFTOSA, 1984), e em 1993, o documento intitulado “*Fundamentos basicos para la creacion y mantenimiento de áreas libres de fiebre aftosa*” (PANAFTOSA, 1993), ambos fazendo referência às diretrizes presentes no Código Terrestre.

Como mencionado, as perspectivas de utilização das zonas livres como estratégia de erradicação de doenças, como a febre aftosa, motivaram a inclusão no Código Terrestre, dos conceitos de zonificação e de regionalização, a partir de 1992. As definições de *zona* e *região* foram inseridas no Art. 1.4.4.2 da 6ª edição do Código Terrestre com a seguinte redação: “*Uma ‘zona’ é uma parte de um país delimitada para fins de controle sanitário. Uma ‘região’ é um conjunto de países, ou de zonas de países contíguos, delimitada para fins de controle sanitário*” (OIE, 1992, p. 43, tradução livre). A partir da 13ª edição do Código Terrestre, de 2004, o conceito de “regionalização” deixou de ser considerado, conforme expresso no Art. 1.3.5.1: “*Para efeito do presente Código Terrestre, os termos “zonificação” e “regionalização” têm o mesmo significado*” (OIE, 2004b, p. 51, tradução livre). O termo “regionalização” foi definitivamente retirado do Código Terrestre a partir de sua 15ª edição, em 2006.

Em 1995, a importância destes novos conceitos foi reforçada com a aprovação do Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias, durante a Rodada do Uruguai de negociações comerciais multilaterais, ocasião em que foi criada a OMC (WTO, 1995). Os conceitos de zonificação/regionalização foram incluídos entre os princípios técnicos e científicos que devem nortear o comércio entre países, ficando, como destacado anteriormente, a OIE identificada como organismo internacional de referência para questões relativas à saúde animal e às zoonoses. Inicialmente, no caso da febre aftosa, a condição de zona livre ficou limitada a rebanhos não submetidos à vacinação, incluindo-se a opção de “zona livre de febre aftosa onde se pratica a vacinação”, apenas na versão seguinte do Código Terrestre, publicada em 1998 (OIE, 1998). A partir de 1998, a OIE passou a gozar do mandato acordado com a OMC para reconhecer oficialmente, para fins comerciais, o status de zonas livres de doenças. O reconhecimento sanitário é voluntário e, além da febre aftosa, se aplica, atualmente, a cinco doenças: encefalopatia espongiforme bovina; peste dos pequenos ruminantes; peripneumonia contagiosa bovina; peste equina; peste suína clássica e peste bovina. A OIE, desde que recebeu o mandato de reconhecimento oficial da condição sanitária dos países membros, adotou procedimentos específicos para avaliação dos pleitos apresentados, que foram definitivamente incorporados ao Código Terrestre em sua 18ª edição, de 2009, com a inserção do Capítulo 1.6, denominado “*Situação sanitária referente às doenças da lista da OIE: procedimentos para sua declaração pelos membros e para seu reconhecimento oficial pela OIE*”

Retornando à 1992, com base no conceito de zonificação adotado pela OIE, o governo brasileiro publicou, no mês de setembro, a “*Revisão da política e estratégias de combate à febre aftosa implantadas pelo projeto de controle das doenças dos animais*”. Esta revisão foi elaborada com participação dos setores público e privado do país e apoio do PANAFTOSA, e estabeleceu a meta nacional de erradicação da doença até 2005. Significou importante marco na luta contra a doença, fundamentando-se em três pontos principais: i) afirmação quanto ao objetivo de

erradicação da doença, proposto a partir de 1983; ii) substituição da estratégia de atuação por unidades da Federação pela intervenção por circuitos pecuários; e iii) maior envolvimento de toda cadeia produtiva nas diversas etapas de intervenção: planejamento, execução, avaliação e financiamento (REVISÃO..., 1992). Os circuitos pecuários definidos na época podem ser avaliados na Figura 2. Foram estabelecidos considerando, principalmente: estudo de séries históricas sobre o trânsito de animais; conhecimento local de profissionais e produtores; e avaliação dos sistemas de produção predominantes em cada região. A delimitação desses circuitos consistiu na identificação de espaços geográficos com certa independência no que se refere ao comércio e trânsito de animais e de seus produtos de risco para febre aftosa. Buscaram, portanto, representar regiões de economia pecuária relativamente independentes, com grande probabilidade de absorção de todas as fases de produção da bovinocultura (cria, recria, engorda e abate). Como será demonstrado no item seguinte deste documento, os circuitos pecuários apresentaram-se como base geográfica para implantação da maior parte das zonas livres de febre aftosa no país. Alterações mais expressivas ocorreram particularmente no Circuito Pecuário Norte, onde a qualidade da informação disponível à época não permitiu uma delimitação mais precisa em 1992. O gradativo fortalecimento das estruturas de defesa sanitária animal nos estados envolvidos, e consequente disponibilidade de informação de melhor qualidade, possibilitou alterações na configuração do Circuito Pecuário Norte, destacando: i) incorporação de todo o Estado de Tocantins ao Circuito Pecuário Leste; ii) divisão do Estado do Pará em três áreas epidemiológicas distintas, possibilitando o reconhecimento gradativo do território estadual como zona livre da doença; e iii) evolução independente dos Estados do Acre e de Rondônia, incluindo parte do território contíguo com o Estado do Amazonas.

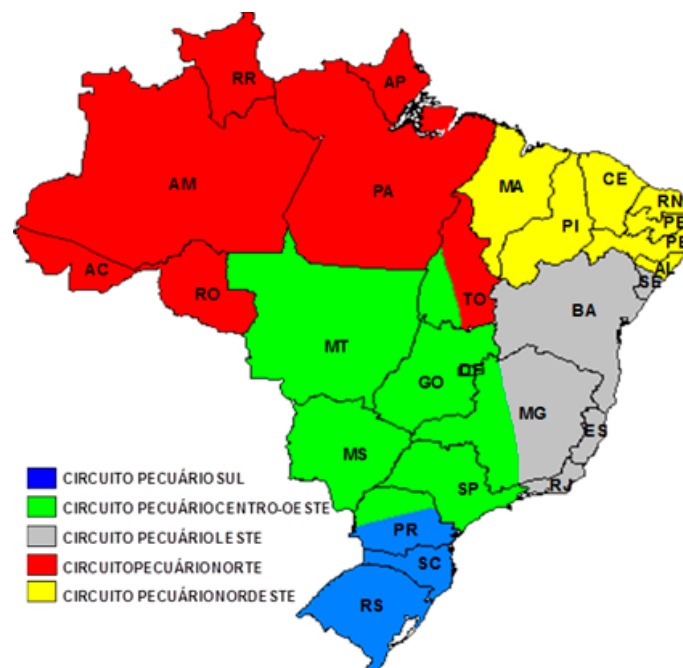


Figura 02. Definição dos circuitos pecuários, Brasil, 1992

Com base nos acontecimentos registrados em 1992, no ano seguinte, as normas de intervenção contra a febre aftosa foram atualizadas por meio da publicação da Portaria Ministerial nº 121, de 29/03/1993, incluindo, conforme seu Art. 4º, a delegação de competência para os serviços veterinários estaduais exercerem, nas respectivas áreas de jurisdição, as atividades de fiscalização aprovadas na Portaria e demais instruções complementares (BRASIL, 1993). A discussão e definição das medidas zoossanitárias acordadas para adoção em cada localidade, ocorreram nos fóruns denominados “Reuniões dos Circuitos Pecuários”, sob coordenação do Ministério da Agricultura e com ampla participação dos setores público e privado. No período de 11 anos foram realizadas 34 reuniões, sempre buscando a motivação e sensibilização política e social para o objetivo de erradicação da febre aftosa. Nestes fóruns, foram definidos e organizados grupos de trabalho envolvendo profissionais que atuavam nos serviços veterinários estaduais e na iniciativa privada, além do Ministério da Agricultura, o que permitiu avanços em diferentes atividades necessárias para implantação das zonas livres de febre aftosa, com destaque para o delineamento e a coordenação dos estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral.

Os primeiros resultados na erradicação da doença foram obtidos em 1998, com reconhecimento dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina como zona livre de febre aftosa com vacinação, destacando que esta foi a primeira zona livre de febre aftosa com vacinação reconhecida pela OIE. O processo de incorporação gradativa de zonas livres da doença no país seguiu como prioridade para o serviço veterinário brasileiro, finalizando-se em 2018, com incorporação à zona livre de febre aftosa com vacinação dos Estados do Amapá, Amazonas e Roraima, mais partes do Estado do Pará.

Paralelamente aos avanços no reconhecimento de zonas livres de febre aftosa na América do Sul, a partir do final da década de noventa, observou-se uma instabilidade epidemiológica na região do Cone Sul, com recorrentes focos da doença em zonas livres, sem hipóteses plausíveis sobre a origem do agente viral (NARANJO e COSIVI, 2013). Esta instabilidade colocou em dúvida as ações conduzidas na região, particularmente quanto à capacidade dos serviços veterinários oficiais certificarem a condição de livre da doença, especialmente quando envolvidos rebanhos submetidos à vacinação sistemática contra a febre aftosa. Os problemas verificados na América do Sul também colocaram em questão a validade do reconhecimento internacional emitido pela OIE, estimulando alterações significativas no Código Terrestre, e levando a Organização a realizar sua primeira missão técnica de campo para febre aftosa, no período de 6 a 12 de dezembro de 2006, nos países do Cone Sul. Com base nas recomendações da missão técnica da OIE e após embates técnicos com representantes dos

serviços veterinários oficiais dos países envolvidos e participação do PANAFTOSA, foi acordada a implantação de zonas de alta vigilância nas regiões de fronteira internacional, abrangendo áreas com, pelo menos, 15 km de distância a partir das linhas de divisa entre os países. Os serviços veterinários da região do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), estavam representados, à época, além das autoridades sanitárias nacionais, pelo Comitê Veterinário Permanente do Cone Sul – CVP, criado em maio de 2003, por resolução dos Ministros de Agricultura dos referidos países. O CVP está localizado em Montevideo, Uruguai, e apresenta como missão³: “*Coordenar ações e incrementar a capacidade regional de prevenir, controlar e evitar os impactos e riscos sanitários que afetam a produção e comercialização de animais, produtos e subprodutos de origem animal na Região*”.

No caso do Brasil, a instabilidade epidemiológica no Cone Sul levou à adoção de ações de emergência veterinária para contenção de focos de febre aftosa no período de 1998 a 2006, representadas na Figura 1 por setas vermelhas (setas pontilhadas indicando ações em áreas sem reconhecimento de livre da doença e setas contínuas representando reintroduções em zonas livres com vacinação). Em 1998, após 38 meses de ausência da doença em Mato Grosso do Sul, foram registrados focos no município de Porto Murtinho e, no ano seguinte, em Naviraí, ambos municípios localizados na região de fronteira internacional. Em 2000 e 2001, foram registradas reintroduções do agente viral no Rio Grande do Sul, como consequência de problemas zoossanitários posteriormente confirmados na Argentina. Os últimos focos da doença foram registrados no período de setembro de 2005 a abril de 2006, em três municípios de Mato Grosso do Sul também localizados na fronteira internacional (Eldorado, Japorã e Mundo Novo), com reflexos em cinco municípios do Estado do Paraná (Bela Vista do Paraíso, Grandes Rios, Loanda, Maringá e São Sebastião da Amoreira).

Estas últimas ocorrências de febre aftosa no país apontaram para necessidade de nova revisão das normas internas do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA, o que foi contemplado através da publicação da Instrução Normativa Ministerial n° 44, de 2/10/2007 (BRASIL, 2007). Este instrumento legal atualizou e unificou as normas de luta contra a doença que estavam distribuídas em inúmeros atos administrativos, o que dificultava sua interpretação e aplicação. Entre as atualizações técnicas realizadas destaca-se a adequação da definição de caso para febre aftosa às diretrizes internacionais. As ocorrências também motivaram a revisão dos procedimentos de emergência veterinária, com destaque para

³ Disponível em <http://www.cvpconosur.org/cvp-institucional/>

o fortalecimento das relações institucionais para intervenção zoossanitária. A partir de 2007 foram revistas e publicadas novas versões do plano de contingência para atuação em focos de febre aftosa (BRASIL, 2009)⁴ e iniciadas discussões para melhor inserção do Ministério da Agricultura no Sistema Nacional de Proteção e Defesa Civil – SINPDEC. Estas discussões culminaram com a instituição, em 2018, do Sistema Nacional de Emergências Agropecuárias - SINEAGRO, que compreende o conjunto de órgãos, atividades, padrões e procedimentos, com atuação permanente e coordenada para a preparação e resposta às emergências agropecuárias (BRASIL, 2018).

Com a impossibilidade de atendimento da meta de erradicação da febre aftosa até 2009, conforme proposto no Plano de Ação 1988 – 2009 do PHEFA, em 2010, os países sul-americanos elaboraram um segundo Plano de Ação, buscando a erradicação da doença até 2020 (PROGRAMA..., 2010), em consonância com o projeto mundial de erradicação da doença formulado em conjunto pela OIE e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO. Como primeiro produto do Plano de Ação 2011 – 2020, em 2015 foi disponibilizado o “Guia técnico de trabalho para a última etapa do PHEFA”, elaborado pelo PANAFTOSA e representantes dos serviços veterinários da América do Sul, com orientações gerais para implantação e manutenção de zonas livres de febre aftosa e para suspensão gradativa da vacinação (PANAFTOSA, 2017b).

O Brasil foi o primeiro país da América do Sul a internalizar as novas metas do PHEFA, estabelecendo um plano de ação interno, com objetivo global de país livre de febre aftosa sem vacinação até 2026 (MINISTÉRIO..., 2017), conforme destacado na Figura 1. Para isto, o Ministério da Agricultura, sob coordenação do Departamento de Saúde Animal e com apoio e participação do PANAFTOSA e de representantes dos setores privados e do meio acadêmico, disponibilizou o Plano Estratégico 2017 – 2026, para contribuições de toda sociedade interessada⁵. O objetivo geral do Plano é “...*criar e manter condições sustentáveis para garantir o status de país livre da febre aftosa e ampliar as zonas livres sem vacinação, protegendo o patrimônio pecuário nacional e gerando o máximo de benefícios aos atores envolvidos e à sociedade brasileira*” (MINISTÉRIO..., 2017, p. 19). Apresenta como objetivos específicos: i) tornar o país livre de febre aftosa sem vacinação com reconhecimento internacional, de forma gradativa e regionalizada, considerando as condições epidemiológicas, geográficas, político-econômicas, institucionais e técnico-operacionais; ii) fortalecer as medidas de prevenção e

⁴ Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/>

⁵ Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/pnefa-2017-2026>

redução das vulnerabilidades para febre aftosa em todo país; iii) aprimorar as capacidades do serviço veterinário oficial em todo país, priorizando as regiões mais vulneráveis, além daquelas com melhores perspectivas de avanço para o status de zona livre de febre aftosa sem vacinação; e iv) fortalecer as parcerias público-privadas, ampliando a participação comunitária no processo decisório e nas ações de prevenção da febre aftosa em todo país, para garantir sustentabilidade técnica, política e financeira ao Programa.

Em complemento à linha do tempo apresentada, e de forma a permitir uma visão global da evolução das ações de controle e erradicação da febre aftosa no Brasil, na sequência está disponibilizada a Figura 3 contendo série anual de focos de febre aftosa acumulados para todo o país, no período de 1970 a 2017, juntamente com o percentual anual de bovinos e bubalinos vacinados contra a doença. Em complemento, a partir de 1989, é incluída a série histórica sobre o total de carne bovina e suína exportada, com objetivo de registrar a importância e contribuição do processo de erradicação da febre aftosa na sustentação do mercado de exportação brasileiro, que foi impulsionado nas últimas duas décadas por um conjunto complexo de fatores econômicos e conjunturais.

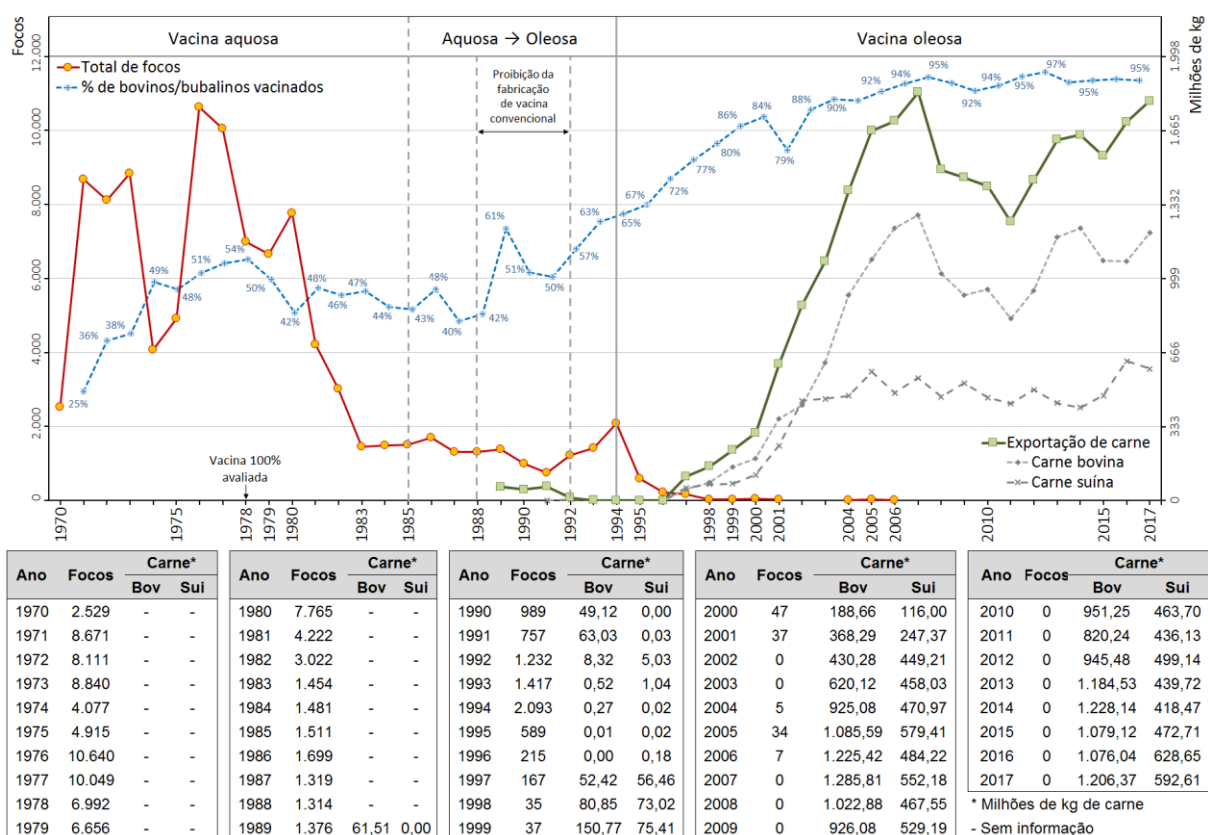


Figura 03. Ocorrência anual de febre aftosa, percentual de animais vacinados e total de carne exportada, Brasil, 1970 a 2017

Fontes: 1. Focos e percentual de vacinação: MAPA, com base em informações dos serviços veterinários estaduais;

2. Carne exportada: ALICEWEB - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

É importante esclarecer que para realidades como a do Brasil, onde a intervenção contra a febre aftosa possui um componente geográfico muito evidente, dados acumulados por ano e para todo o país mostram-se reducionistas e não possibilitam uma visão adequada das diferentes condições e particularidades encontradas. Permitem, apenas, uma avaliação da tendência global de controle da doença, associada aos distintos eventos históricos de intervenção no país.

Quanto ao registro de focos da doença, na primeira década da série histórica considerada, observa-se uma variação muito grande no número de ocorrências, devido tanto a surtos epidêmicos em rebanhos com baixa cobertura imunitária, utilizando-se vacinas ainda de baixa qualidade imunogênica, como à maior precariedade no registro das informações na época. Naquele período, quase metade dos focos foram registrados nos estados da Região Sul do país, com maior incidência no Rio Grande do Sul. Em 1976, destaca-se surto epidêmico por vírus tipo “A” no Rio Grande do Sul (48% dos focos registrados), que seguiu no ano seguinte também nos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo que, juntos, representaram quase 70% do total de focos registrados no país nos referidos anos. Em 1980, novo surto epidêmico foi registrado no Rio Grande do Sul, desta vez por vírus tipo “O”.

A forte redução no número de focos iniciada a partir do início dos anos 1980, por sua vez, deveu-se, de um lado, à crescente cobertura das ações de controle da doença, atingindo 78% do território nacional em 1983, e da maior disponibilidade e qualidade da vacina que, desde 1978, passou a ter toda sua produção submetida à avaliação de eficiência pelo Ministério da Agricultura. A partir de 1983, observa-se uma tendência de redução do número de focos, conseqüente, principalmente, da consolidação dos programas de luta contra a febre aftosa na Região Sul do país (com destaque para a cobertura vacinal) onde, até então, era registrado o maior número de casos da doença. Essa tendência foi invertida entre 1992 e 1994, resultado, segundo relatórios de avaliação do PNEFA, do fortalecimento das ações de vigilância a partir da Revisão das ações do Programa implantadas em 1992, o que se comprova, por exemplo, verificando que em 1994, 48% dos focos foram registrados em estados da Região Nordeste do Brasil, onde se intensificaram as ações dos serviços veterinários estaduais. Naquele período, também deve ser destacado o cenário de hiperinflação predominante no país, tornando a compra e venda de bezerros um negócio atrativo, o que estimulou a movimentação animal e o conseqüente maior risco de disseminação da febre aftosa. A partir de 1995, observa-se outra redução expressiva do número de focos, devido, de um lado, à estabilidade econômica e monetária, resultando na diminuição do comércio de animais em feiras e leilões, e, de outro, a melhorias do diagnóstico laboratorial e do registro de casos, com adequada distinção entre febre aftosa e outras doenças vesiculares.

Em relação ao percentual de bovinos e bubalinos vacinados no país, deve-se reforçar que o índice utilizado representa um valor global, não refletindo as diferentes realidades e estratégias utilizadas em cada unidade da Federação. Para cálculo do percentual utilizado, até 1998, o total de animais vacinados foi retirado da série *Boletim de Defesa Sanitária Animal* publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA⁶ (MINISTÉRIO....., 1950-1998); nos anos de 1999 e 2000, os valores foram obtidos nos informes de *Situação dos Programas de Erradicação da Febre Aftosa na América do Sul*, publicados pelo PANAFTOSA; e, a partir de 2001, nos relatórios internos do Departamento de Saúde Animal do MAPA, utilizando apenas uma etapa de vacinação envolvendo todo o rebanho bovino e bubalino, de preferência para aquelas realizadas no segundo semestre de cada ano. Como rebanho total de bovinos e bubalinos do país (denominador para cálculo do percentual de animais vacinados), optou-se por utilizar as informações publicadas, até 2016, na série *Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM*, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (para 2017, o valor foi baseado nas informações disponibilizadas pelos serviços veterinários estaduais). Independente da característica genérica do indicador, o esquema disponibilizado busca evidenciar os seguintes pontos: i) de forma global, verifica-se uma relação inversa entre o total anual de focos e a cobertura imunitária; ii) até 1984 a vacina utilizada no país era do tipo convencional, sendo substituída gradativamente pela vacina com adjuvante oleoso entre os anos de 1985 e 1994, contribuindo fortemente para manutenção de bons níveis de imunidade populacional; e iii) a partir do início da década de 1990, verifica-se uma tendência crescente de cobertura vacinal, mantendo-se próxima a 90% a partir dos anos 2000. Particularmente em 2001, observa-se uma interrupção na tendência de crescimento, consequente da suspensão da vacinação nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, visando a evolução para condição zoossanitária de zona livre sem vacinação. Com a ocorrência de focos da doença em 2001 no Rio Grande do Sul, a vacinação foi retomada naquele Estado, mantendo-se sua suspensão em Santa Catarina, Estado reconhecido como zona livre sem vacinação em 2007.

Particularmente no período entre 1980 e 1988, na Figura 3 observa-se uma aparente contradição, com redução do número de casos da doença acompanhada por baixos percentuais de animais vacinados. Isso, explica-se, em parte, devido à escala nacional dos dados. Apesar dos baixos índices globais de cobertura vacinal, deve-se destacar que nas Regiões Sul e Sudeste, onde se registrava o maior número de focos, os percentuais de vacinação eram superiores a 80% no período em questão.

⁶ Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/boletins>

Ainda em relação à vacinação, deve-se reforçar o momento relevante na estratégia de erradicação da doença representado pela substituição do uso da vacina convencional pela vacina com adjuvante oleoso, fato também destacado na Figura 3. Após o período de ensaios e experimentos com a “vacina oleosa”, iniciado em meados dos anos setenta, sua disponibilidade comercial ocorreu a partir de 1985, passando a substituir gradativamente a produção da vacina convencional (MINISTÉRIO..., 1950-1998). Em 30 de novembro de 1988 foi publicada a Portaria Ministerial n° 280, que, entre outras normas de profilaxia e combate à febre aftosa, definiu um prazo de 12 meses a partir de sua publicação para restringir a produção no país apenas de vacinas com indução de proteção por período de, no mínimo, seis meses. Em 1990, por meio da Portaria n° 27, de 5/1/1990, o prazo foi prorrogado para até o final de 1992. Posteriormente, devido à disponibilidade no mercado de cerca de 85 milhões de doses da vacina convencional produzidas em 1991 (MINISTÉRIO..., 1950-1998), o Ministério da Agricultura autorizou a comercialização no país do estoque remanescente até o ano de 1994.

No que diz respeito ao total anual de carne bovina e suína exportada pelo país, registra-se uma forte tendência de crescimento a partir do final da década de 1990, coincidente com o início da implantação das zonas livres de febre aftosa. Observa-se que as ocorrências da doença registradas no país entre os anos de 1998 e 2006, mesmo em zonas livres, não afetaram a forte tendência de crescimento, com reflexos de queda limitados apenas às unidades Federativas diretamente atingidas pelos focos, fato encoberto pelo volume total exportado. A queda na exportação a partir de 2007, foi consequente, basicamente, da crise econômica e financeira mundial, com reflexo global no comércio de *commodities*.

Para finalizar a síntese histórica sobre a febre aftosa no Brasil, e de forma a permitir uma visão no tempo e espaço sobre a ocorrência da doença, na Figura 4 estão disponibilizados mapas com o registro semanal de doença vesicular na América do Sul, acumulados por quadrante epidemiológico e em séries anuais de cinco, quatro e três anos, desde 1978, disponibilizado pelo PANAFTOSA. A partir de 2003, os dados referem-se especificamente à febre aftosa. A série anual foi reduzida entre os anos de 1997 e 2002 de forma a destacar a instabilidade epidemiológica na região do Cone Sul e a epidemia registrada na Argentina e Uruguai nos anos de 2000 e 2001, com reflexos no Rio Grande do Sul. No último período, os focos de febre aftosa concentraram-se apenas em 2017, com registro de sete ocorrências na Colômbia. Neste período, o sinal de interrogação sobre a Venezuela indica a incerteza quanto à condição para doença naquele país. Detalhes sobre o registro e a comunicação de ocorrências zoossanitárias em mapas com quadrantes geográficos utilizados no sistema de informação e vigilância para doenças vesiculares na América do Sul estão descritos por Astudillo e Deppermann (1980), Astudillo (1982) e Astudillo et al. (1986), e os registros no período de 1978 a abril de 2013 também estão discutidos por Naranjo e Cosivi (2013).

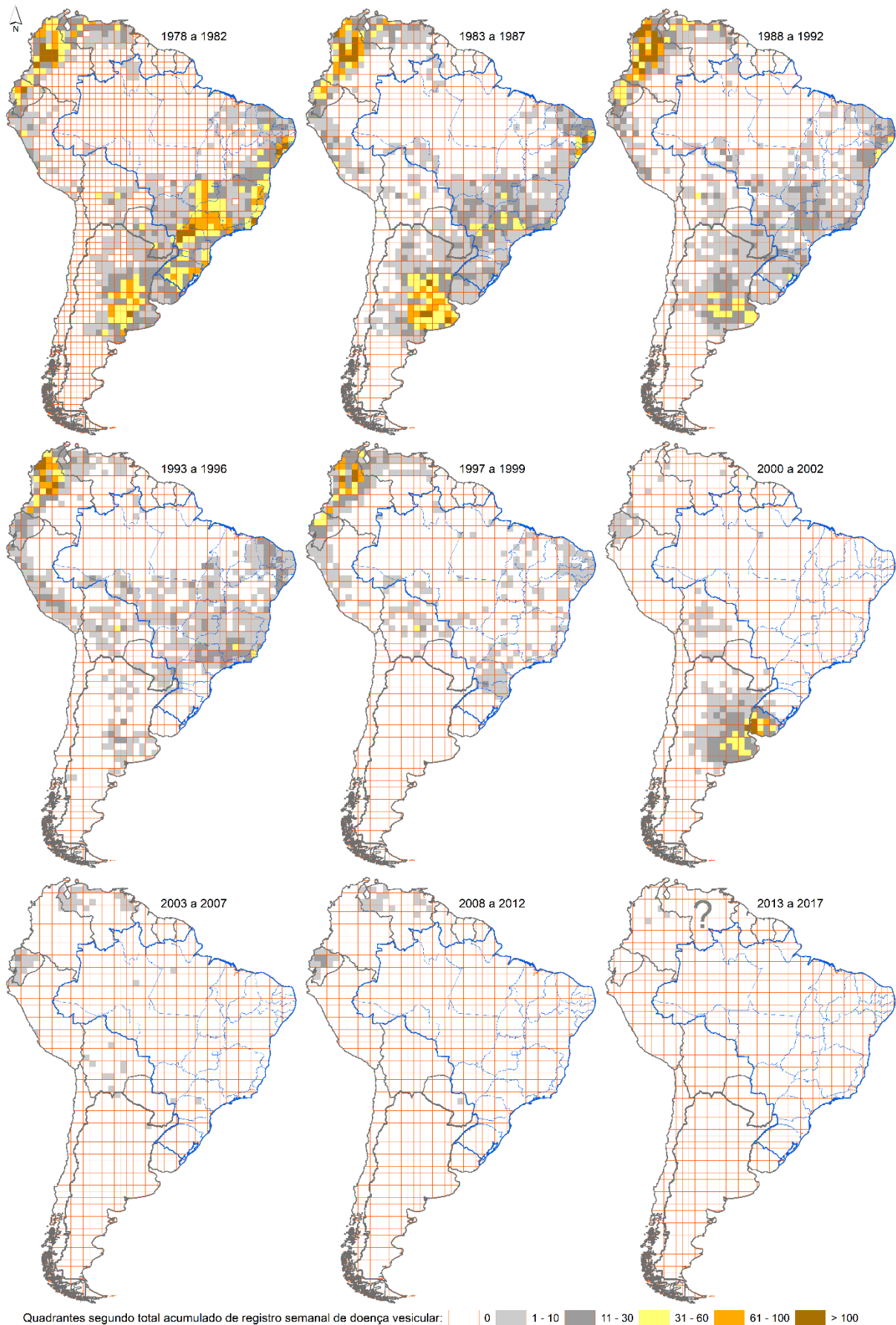


Figura 04. Quadrantes epidemiológicos com registro semanal de doença vesicular acumulados por series anuais
 Fonte: PANAFTOSA (até 2002, doença vesicular; a partir de 2003, febre aftosa)

Estudos epidemiológicos sobre a febre aftosa

Conforme apontou Astudillo (1992), a atuação no controle da febre aftosa forneceu oportunidade para aperfeiçoamento de conceitos e práticas no campo da epidemiologia. No Brasil, diferentes momentos relacionados com a intervenção contra a doença motivaram a discussão científica e resultaram em estudos conduzidos tanto pelo serviço veterinário oficial como por instituições de ensino e pesquisa. Na sequência, de forma resumida e sem a intenção de esgotar o tema, são destacados alguns trabalhos realizados no país em apoio à gestão dos programas de controle e de erradicação da febre aftosa, com especial atenção para os estudos conduzidos pelo serviço veterinário oficial a partir do final da década de 1990, com objetivo de apoiar os pleitos nacionais de implantação, manutenção ou recuperação da condição de zonas livres da doença.

O primeiro estudo com abrangência nacional, que se tem registro no Brasil, foi realizado em 1975 e 1976 nas unidades da Federação integrantes das Regiões Sul (exceto Rio Grande do Sul), Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (exceto Sergipe), mais o Estado de Roraima (BRASIL, 1977). Entre 1977 e 1980, o estudo foi complementado nos demais estados e territórios da Região Norte (BRASIL, 1981). O trabalho foi executado por médicos veterinários do Plano Nacional de Combate à Febre Aftosa, sob orientação da equipe técnica da Coordenação de Combate à Febre Aftosa do Ministério da Agricultura. Teve como objetivo geral a obtenção de diretrizes para orientação dos programas de combate à febre aftosa, raiva e brucelose, e como objetivos específicos: conhecer a frequência de ocorrência da febre aftosa, brucelose e raiva; verificar a interferência de alguns fatores na frequência dessas doenças, nas diferentes localidades estudadas; conhecer a estrutura das propriedades pecuárias, suas práticas sanitárias e de criação; e determinar os meios de comunicação de massa mais aceitos pelos criadores. No caso da febre aftosa, foi realizado um estudo retrospectivo, englobando um período de cinco anos, utilizando o método de entrevista direta com o proprietário ou responsável pela propriedade. Todo o trabalho envolveu a entrevista de 21.812 produtores, dos quais, 2.643 (12,1% do total) declararam ter observado a presença de animais doentes por febre aftosa na propriedade no último ano da série temporal considerada. A distribuição geográfica das taxas de rebanhos afetados, segundo declaração dos entrevistados, encontra-se na Figura 5, por unidade da Federação e para o último ano do período considerado. Ainda em relação à febre aftosa, na Região Norte, o trabalho também incluiu estudo transversal para avaliar a prevalência de bovinos reagentes ao teste VIAA-IDGA (imunodifusão em ágar-gel para detecção de antígeno associado à infecção viral). Foram coletadas amostras de soro sanguíneo em 7.850 bovinos distribuídos em 860 propriedades, com 32% de animais positivos, variando entre 20,1% no Amapá a 48,9% no Pará. Quanto a estes resultados, no relatório final do estudo é feita a ressalva sobre o caráter não

conclusivo da prova VAA-IDGA nas condições do estudo, uma vez que as amostras não foram associadas a idade ou histórico de vacinação dos animais, elemento que poderia contribuir para resultados falso-positivos. De forma geral, os resultados do estudo demonstraram a falta de efetividade das ações de controle da febre aftosa conduzidas até aquele momento, e apoiaram a justificativa de implantação da segunda etapa de luta contra a doença, denominada de PNCFA, com metas estabelecidas para o período de 1983 a 1987 (BRASIL, 1983).

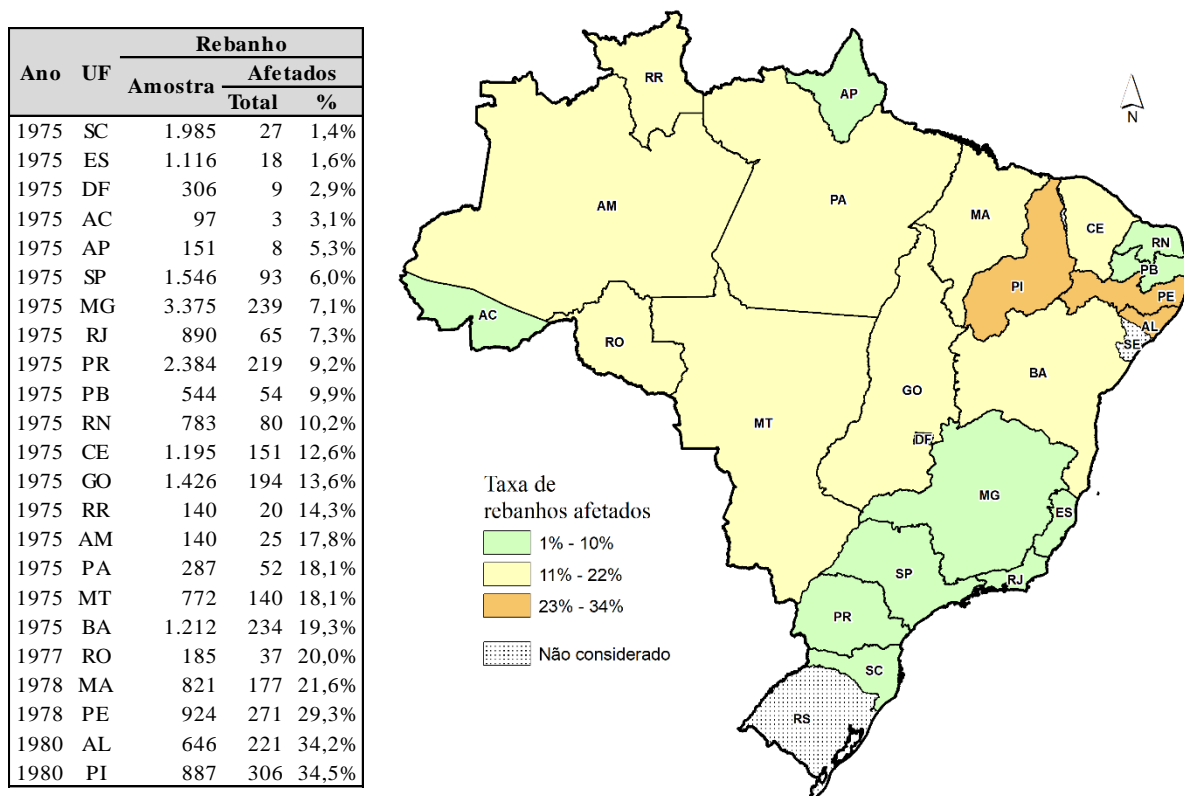


Figura 05. Taxa de rebanhos afetados por febre aftosa, segundo declaração do proprietário
 FONTE: Brasil (1977, 1981)

O PNCFA, iniciado em 1983, foi concebido com base em abordagens epidemiológicas sustentadas por estudos liderados pelo PANAFTOSA ao final da década de 1970. A fundamentação teórica destas abordagens foi sustentada na premissa de que os ecossistemas de febre aftosa são determinados pelas características da produção pecuária, conforme descrito por Obiaga et al. (1979), e nominado por Astudillo (1984) como “*formas de organização da produção pecuária como determinantes de risco de febre aftosa*”. Com base nessas abordagens, nos países da América do Sul foram realizados diferentes estudos para caracterização dos sistemas de produção pecuária predominantes nas regiões submetidas a programas de controle e erradicação da doença. Esses estudos foram realizados utilizando-se de indicadores propostos pelo PANAFTOSA, elaborados, principalmente, a partir de dados disponíveis nas bases de cadastro de propriedades rurais e de movimentação animal sob controle do serviço veterinário oficial.

O conceito de ecossistemas para febre aftosa foi descrito pela primeira vez por Rosenberg e Goic (1973) que, após uma avaliação dos programas de controle e prevenção da febre aftosa nas Américas, concluíram que a seleção de procedimentos mais eficientes e eficazes de intervenção só poderia ocorrer a partir de um conhecimento preciso dos fatores de risco de aquisição da febre aftosa nos diferentes sistemas ecológicos prevalentes na América do Sul. Apesar de reconhecerem a complexidade do tema, propuseram uma abordagem simplificada, inicialmente limitada a fatores ecológicos, distinguindo quatro tipos de ecossistemas para febre aftosa na América do Sul: i) áreas livres da doença; ii) áreas de ocorrência esporádica; iii) áreas de ocorrência endêmica, com claro predomínio estacional (secundárias); e iv) áreas de ocorrência endêmica, com presença contínua da doença (primárias). Segundo os autores, essa simplificação hipotética dos ecossistemas fundamentava-se na relação entre o vírus e o meio ambiente, incluindo as seguintes alternativas epidemiológicas: i) o vírus está no ecossistema em distintos graus de equilíbrio podendo, por alteração do mesmo, ocasionar a doença; ii) o vírus é introduzido na área, a partir de interferência externa; e iii) uma combinação das duas alternativas anteriores. Posteriormente, o conceito dos ecossistemas foi generalizado por Rosenberg (1977) para doenças transmissíveis de curso agudo, mantendo-se as condições ecológicas como determinantes da relação entre fontes de infecção e indivíduos susceptíveis, responsável pelas diferentes condutas epidemiológicas das doenças. Uma representação simplificada desses ecossistemas, proposta por Rosenberg e Goic (1973), está reproduzida na Figura 6, onde o círculo identifica o ecossistema e as setas a febre aftosa. No esquema apresentado, a parte superior retrata os ecossistemas em uma fase anterior à implantação de um programa de erradicação e a parte inferior, os mesmos ecossistemas logo após completada uma primeira fase do programa de erradicação.

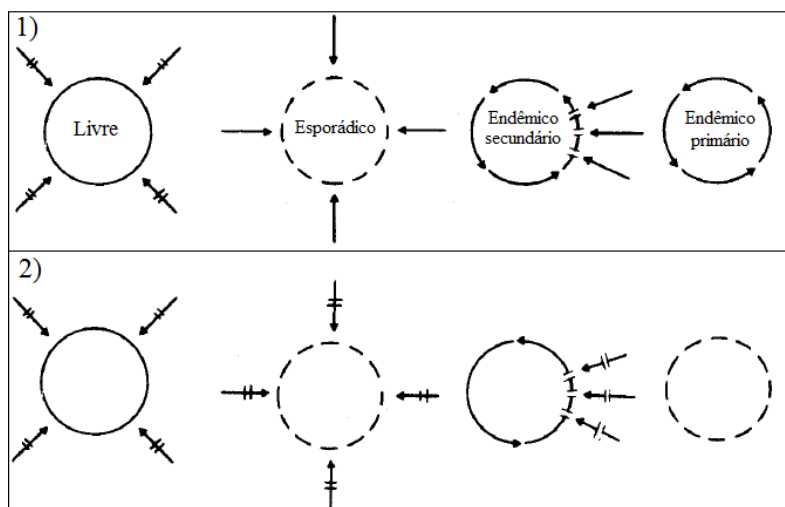


Figura 06. Esquema simplificado dos ecossistemas de febre aftosa: 1) condição anterior à implantação de um programa de erradicação; 2) condição após a primeira fase de um programa de erradicação (adaptado de Rosenberg e Goic, 1973)

Na sequência, o conceito dos ecossistemas evoluiu para um enfoque socioeconômico, buscando-se, segundo Obiaga et al. (1979), uma nova orientação para identificação, análise e solução de problemas sanitários em um contexto integral. Os autores apresentaram a estrutura da produção pecuária como determinante dos ecossistemas de febre aftosa, identificando quatro tipos de atividade econômica que resultam em formas diferentes de manipulação da produção pecuária, determinando, por sua vez, os tipos de comportamento regional da doença: economia pecuária extrativista; economia mista de transformação para carne; economia de transformação para leite; e economia mercantil simples (pecuária complementar e pecuária de subsistência). Em síntese, os autores consideraram que “...a organização social da população bovina (e o mesmo vale para todas as espécies domésticas), depende quase exclusivamente da apropriação que o homem organizado faz delas para o seu benefício. Dessa forma, os programas sanitários devem fundamentar-se não em modelos funcionalistas vírus-infecção-doença-imunidade, mas em estudos regionais cujo fundamento geográfico-social determine as estratégias mais adequadas” (p. 42, tradução livre).

No Brasil, uma primeira proposta de regionalização baseada nos ecossistemas de febre aftosa e na estrutura de produção pecuária, foi apresentada no PNCFA, conforme demonstrado na Figura 7, reproduzida de Brasil (1983). Essa regionalização, complementada por estudos da movimentação animal no final da década de 1980, foi base para definição dos circuitos pecuários considerados na reformulação do Programa em 1992 (REVISÃO..., 1992), conforme discutido anteriormente. A proposta de intervenção apresentada em 1983, considerou diversos estudos realizados utilizando-se a série de dados históricos obtidos pelo sistema de vigilância epidemiológica implantado nas unidades da Federação, assim como a análise de dados básicos sobre a estrutura e finalidade da população pecuária, demonstrando que a história natural da febre aftosa apresentava características regionais bem diferenciadas, resumidas em três modalidades epidemiológicas:

“a. *Modalidade Endêmica* - Representada pela Região Oeste do Rio Grande do Sul [...], o complexo Pantanal Matogrossense, a região do Alto Paranaíba, em Minas Gerais com áreas vizinhas da Bahia e, possivelmente, algumas áreas não bem caracterizadas ao Nordeste do país. São regiões de cria de gado de corte, onde a presença de um ou mais tipos de vírus de Febre Aftosa, em convivência com grandes rebanhos bovinos, onde há predominância de matrizes, permite a manutenção do ciclo da doença sem, entretanto, ocasionar graves perdas físicas ao rebanho, precisamente devido à exposição contínua aos vírus existentes.

b. *Modalidade Epiendêmica ou Endêmica Secundária* – São as regiões características de internada, engorda ou terminação, onde a doença é mantida pelo ingresso de animais originados das áreas de cria (*Modalidade Endêmica*), de onde podem vir infectados e constituir fontes de contágio, mesmo que estejam aparentemente sadios. Por outro lado, tratando-se de animais jovens, nem sempre adequadamente vacinados, podem servir como multiplicadores e difusores da doença, ao entrar em contato com animais infectados ou doentes, nas áreas de engorda.

A idade jovem dos animais e a elevada densidade a par da rápida renovação da população de engorda, favorece que a doença possa atingir, nestas áreas, níveis de maior gravidade, ocasionando, portanto, graves consequências econômicas, não somente pela degeneração do estado físico dos animais como pelo entrave à comercialização do boi gordo.

A estas regiões correspondem a área de “campanha”, no Rio Grande do Sul, o Norte do Paraná, o Oeste de São Paulo, o Sul de Mato Grosso do Sul, o Sudeste de Mato Grosso, o Sul de Goiás, o Triângulo Mineiro, o Norte do Rio de Janeiro, o Sul da Bahia e Sergipe.

Nestas áreas concentrou-se o trabalho do PLANO, devido justamente aos graves danos econômicos observados, como foi assinalado anteriormente. Entretanto, é de fundamental importância ter em conta que esta situação deriva das condições sanitárias das regiões de cria (endêmicas).

c. *Modalidade Esporádica ou Paraendêmica* – No restante das áreas pecuárias, onde predominam a exploração leiteira e as explorações médias de ciclo completo ou as pequenas propriedades, que podem ser em forma de colônias, a ocorrência da Febre Aftosa é ocasional. Isto é devido à falta de ingresso e ao pouco movimento, em geral. A alta densidade de população e a comercialização do leite, entretanto, implicam alto risco de difusão, por ocasião de ondas epidêmicas generalizadas. São características desta modalidade, as regiões de colônia no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, o Vale do Paraíba, a Zona da Mata, e o Sul de Minas Gerais, o Sul do Rio de Janeiro e a maior parte do Estado do Espírito Santo” (BRASIL, 1983, p. 14)

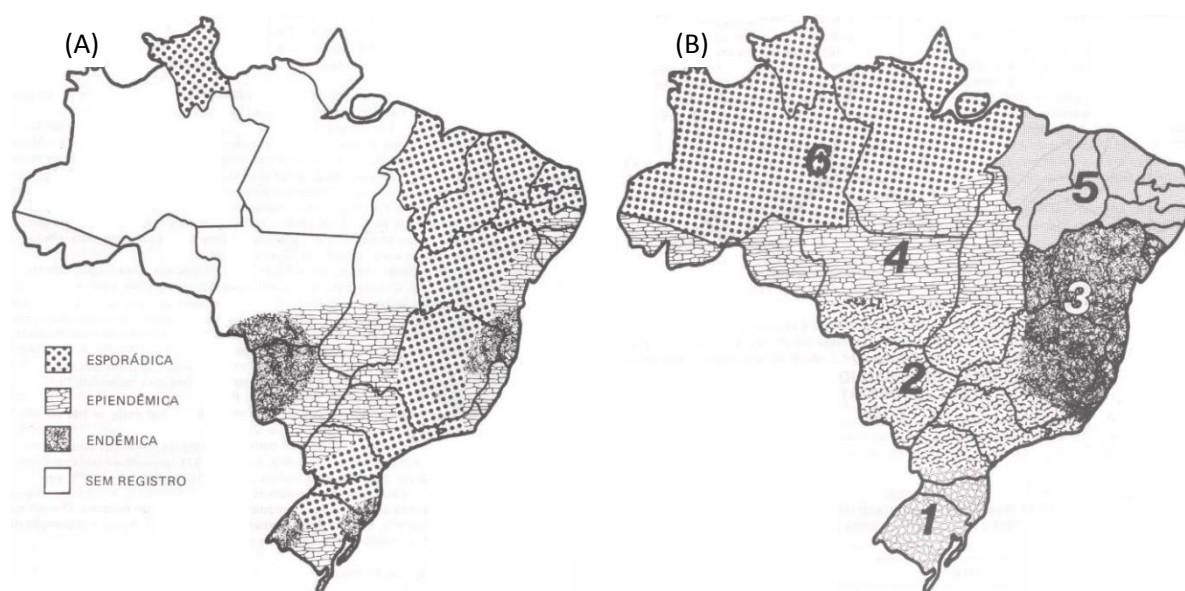


Figura 07. Ecossistemas de febre aftosa, 1981 (A), e regiões da pecuária brasileira como determinantes de febre aftosa (B)
A numeração indica as seis regiões de intervenção zoossanitária previstas no PNCFA, implantado em 1983
Fonte: Plano de controle e erradicação da febre aftosa – PNCFA, segunda etapa (BRASIL, 1983)

Entre os estudos que contribuíram para caracterização dos ecossistemas de febre aftosa no Brasil, destacam-se os trabalhos pioneiros de Astudillo et al. (1986), realizado no Rio Grande Sul, de Martins (1984), conduzido em Santa Catarina, e de Mathias et al. (1981), no pantanal mato-grossense. Neste último, os pesquisadores estimaram o risco potencial de difusão da febre aftosa a partir do pantanal mato-grossense, com base em amostras de soro sanguíneo coletadas de 1.330 bovinos distribuídos em 61 boiadas que se deslocavam para outras regiões do país. Encontraram em torno de 40% de animais positivos à prova VIAA-IDGA, destacando que apenas 30% dos bovinos amostrados apresentavam níveis satisfatórios de imunidade. O estudo apoiou a classificação do pantanal como ecossistema endêmico primário, apresentando-se como risco para as regiões sob sua influência, tanto pelo fornecimento de fontes de infecção como de animais susceptíveis.

Posteriormente, no início da década de 1990, foram realizados vários estudos de caracterização do espaço de produção pecuária e sua relação com os ecossistemas de febre aftosa, dentro de programa de capacitação de médicos veterinários em epidemiologia, conduzido pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio do PANAFTOSA e do serviço veterinário oficial, destacando: o estudo sobre o comportamento epidemiológico da febre aftosa no contexto pecuário do Triângulo Mineiro, MG (PEREIRA, 1986); a redefinição das áreas endêmicas primárias de febre aftosa em Minas Gerais (MADDARENA, 1991); o estudo das modalidades de organização de produção agropecuária e das características epidemiológicas da febre aftosa nos estados de Tocantins e Goiás (JAYME, 1993); a proposta de metodologia para definição e delimitação de circuitos de comercialização bovina, em apoio a intervenção sanitária, considerando o caso da febre aftosa no Mato Grosso do Sul (MORAES, 1993a, 1993b); a análise da relação novilho/vaca como indicador da estrutura populacional para categorização dos tipos de produção pecuária em Minas Gerais, com base nas informações dos censos agropecuários realizados no período entre 1960 e 1985 (BARBOSA, 1994); a avaliação do sistema de organização da produção pecuária e dos ecossistemas de febre aftosa no norte de Minas Gerais (MOURÃO, 1994); a caracterização das formas de organização da produção pecuária e das modalidades de ocorrência da febre aftosa nas mesorregiões homogêneas central e oeste de Minas Gerais (FROIS, 1995); e a avaliação de risco nos focos de febre aftosa em bovinos, registrados em Minas Gerais no período de 1992 a 1994 (CAETANO JUNIOR, 1996).

A atuação com base nos ecossistemas de febre aftosa recomendava intervenções prioritárias nas regiões classificadas como endêmicas primárias. Por exemplo, no caso do pantanal do Mato Grosso do Sul, foram fortalecidas as ações de vacinação, priorizando o emprego da vacina oleosa, já no início de sua produção nos anos de 1984 e 1985, e de fiscalização do trânsito de bovinos com origem na região. No período de 1995 e 1996, com objetivo de avaliar se as ações de combate à febre aftosa, em especial a estratégia de vacinação anual com vacina oleosa, foram suficientes para cortar o ciclo de transmissão endêmica do agente viral, Moraes et al. (1996-1997) realizaram estudo sorológico na região. O estudo envolveu 311 propriedades rurais, selecionadas de forma aleatória em um universo de 2.183 rebanhos, e a coleta de 3.885 amostras de soro sanguíneo em bovinos de 6 a 24 meses de idade. As amostras foram avaliadas pelo PANAFTOSA, utilizando-se como teste de triagem a prova VIAA-IDGA e como teste confirmatório o EITB (*enzyme-linked immunoelectrotransfer blot*). De forma geral, foram identificados 0,30% (6/1.972) de bovinos soropositivos com 6 a 12 meses de idade, e 0,31% (6/1.913) com 13 a 24 meses de idade. Os resultados mostraram-se incompatíveis com transmissão do agente viral e motivaram as autoridades sanitárias locais a seguirem no objetivo de erradicação da doença no Estado, mantendo-se a estratégia de vacinação anual no rebanho bovino e bubalino localizado no pantanal sul-matogrossense.

A partir da adoção pela OIE do conceito de zonificação, estudos epidemiológicos para apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da febre aftosa foram incorporados ao sistema de vigilância para a doença nos países da América do Sul. No Brasil, vários estudos foram realizados no período de 1996 a 2017, com objetivo de implantação ou recuperação da condição zoossanitária de livre de febre aftosa, conforme resumido na Tabela 1. Além dos 26 estudos listados, também foram realizados trabalhos complementares visando a manutenção das zonas livres ou com objetivo de atender demandas de mercados importadores, destacando: em 2008, vigilância sorológica nas fronteiras internacionais com os estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rondônia e Acre; em 2009, estudo sorológico na calha do Rio Amazonas, Estado do Amazonas, e no Estado do Acre (estudos repetidos em 2010 e 2011); em 2010, vigilância sorológica e clínica no Estado de Santa Catarina (zona livre de febre aftosa sem vacinação) e na zona livre de febre aftosa com vacinação, e estudo longitudinal na zona de alta vigilância implantada no Estado do Mato Grosso do Sul; em 2012, novo estudo longitudinal na zona de alta vigilância implantada no Estado do Mato Grosso do Sul; em 2014, vigilância sorológica e clínica na zona livre de febre aftosa com vacinação; e nos anos de 2016 e 2017, a implantação de estudos longitudinais no Estado de Santa Catarina.

Os estudos epidemiológicos realizados com objetivo de apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da febre aftosa são realizados de forma complementar a outros componentes do sistema de vigilância implantado nas áreas sob avaliação. Esses estudos, geralmente do tipo transversal, têm como objetivo respaldar a certificação de ausência de transmissão do agente viral, constatada pela não detecção de casos clínicos da doença no período de tempo requerido pelo Código Terrestre da OIE (24 meses). Nesse contexto, os estudos soropidemiológicos, especialmente em rebanhos submetidos à vacinação massiva e sistemática, envolvem a detecção de animais na população com marca sorológica compatível com infecção pelo vírus da febre aftosa e requerem a utilização de teste laboratorial para identificar a presença de anticorpos contra proteínas não estruturais – PNEs. Este tema demandou intensa discussão na OIE, e suscitou rica publicação científica como, por exemplo, os trabalhos de Cameron e Baldock (1998a, 1998b), Gardner et al. (2000), Ziller et al. (2002), Hanson et al. (2003), Wesley et al. (2003), Greiner e Dekker (2005), Branscum et al. (2006) e Caporale et al. (2012), além do conteúdo do próprio Código Terrestre. Também tem estimulado a produção de manuais técnicos específicos como o de vigilância baseada em risco publicado pela FAO (2014) e o de vigilância publicado pela OIE (2014); e a disponibilização de aplicativos de apoio como o *EpiTools epidemiological calculators*, mantido pela empresa australiana *Ausvet* (SERGEANT, 2018); e o pacote FFD (*Freedom from disease*, v1.0-6 de 19/02/2015), desenvolvido por Ian Kopacka (ian.kopacka@ages.at) para plataforma R, com objetivo de apoiar estudos de detecção realizados em amostragens em dois estágios.

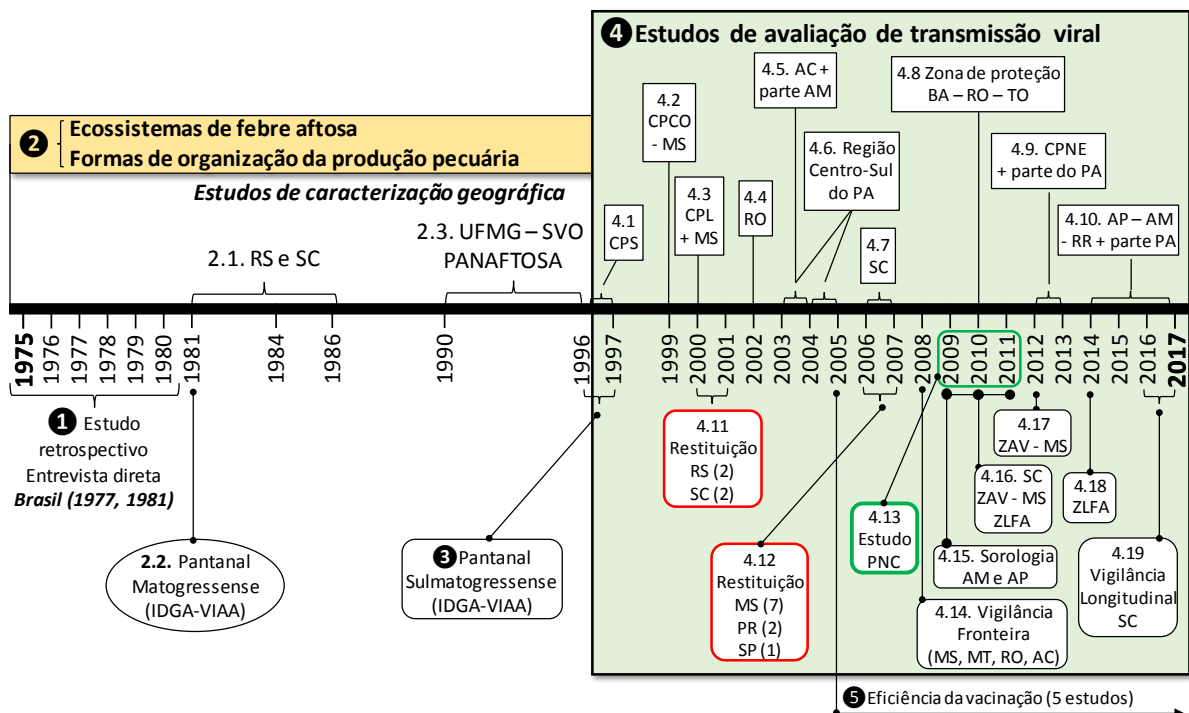
Em complemento à Tabela 1, na Figura 8 é disponibilizada uma representação gráfica identificando, ao longo do período de 1975 a 2017, os principais estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil, destacando: 1) o primeiro estudo realizado pelo serviço veterinário oficial, entre 1975 e 1980; 2) o período de concentração dos estudos sobre ecossistemas para febre aftosa e de caracterização do espaço pecuário, até 1996; 3) estudo conduzido no pantanal sul-

matogrossense, para avaliação de transmissão viral, que ajudou a demonstrar a eficácia da vacinação anual, empregando-se vacina com adjuvante oleoso (MORAES et al., 1997); 4) estudos de avaliação de transmissão viral iniciados a partir de 1996, relacionados com a implantação, manutenção ou recuperação de zonas livres da doença; e 5) estudos de avaliação de cobertura imunitária (não discutidos neste documento). Destaca-se que, entre os anos de 1996 e 2017, foram conduzidos, pelo menos, 40 estudos epidemiológicos em diferentes partes do país.

Tabela 01. Relação dos principais estudos epidemiológicos realizados com objetivo de apoiar os pleitos de reconhecimento da condição de zona livre de febre aftosa junto à OIE, 1997 a 2017, Brasil.

ID	Objetivo	Ano		Localidade envolvida	Subpopulações consideradas no delineamento	UPA ¹	Prop ²	Esp ³	Faixa etária (meses)	Amostras ⁴		Testes laboratoriais utilizados ⁵		
		Realização do estudo	Reconhecimento ou restituição							Total	Positivas			
1	Reconhecimento	1996/1997	1998	RS e SC	7	780		Bov	> 6	8.326	9	0,11%	VIAA-IDGA/EITB	
									> 3	1.993	2	0,10%	VIAA-IDGA	
2	Reconhecimento	1999	2000	PR, SP, GO, MT, DF e parte de MG	3	1.053	2.312	Bov	6 a 24	38.280	392	1,02%	VIAA-IDGA/EITB	
3	Reconhecimento	2000	2001	MS, TO, BA, SE, ES, RJ e partes de GO, MG, MT e SP	6	1.280		Bov	6 a 24	35.410	420	1,19%	ELISA/EITB	
4	Restituição	2001	2002	Região norte RS e fronteira SC/Argentina	2	167		Bov	6 a 24	1.899	0	0,00%	ELISA/EITB	
5	Restituição	2002	2002	RS e SC	3	381	716		Bov	6 a 24	4.353	20	0,46%	ELISA/EITB
									PR	> 3	1.343	0	0,00%	VIAA-IDGA
6	Reconhecimento	2002	2003	RO	1	344	709	Bov	6 a 24	8.918	142	1,59%	ELISA/EITB	
7	Reconhecimento	2003/2004	2005	AC mais parte do AM	1	335	448	Bov	6 a 24	15.598	71	0,46%	ELISA/EITB	
8	Reconhecimento	2003/2004	2007	Região centro-sul do PA	2	649	941	Bov	6 a 24	32.078	88	0,27%	ELISA/EITB	
9	Reconhecimento	2005	2007	Região centro-sul do PA	2	650	1.101	Bov	6 a 24	30.137	678	2,25%	ELISA/EITB	
10	Reconhecimento	2006/2007	2007	SC (livre sem vacinação)	3	468	1.347	Bov	6 a 36	11.059	48	0,43%	ELISA/EITB	
11	Restituição	2006	2008	Área interditada MS	1	382		Bov	6 a 24	7.458	214	2,87%	ELISA/EITB	
12	Restituição	2006	2008	Área interditada PR	1	576		Bov	6 a 24	9.826	34	0,35%	ELISA/EITB	
13	Restituição	2006	2008	Área não interditada MS	1	483		Bov	6 a 12	11.568	26	0,22%	ELISA/EITB	
14	Restituição	2006	2008	Área não interditada PR	1	932		Bov	6 a 12	7.797	24	0,31%	ELISA/EITB	
15	Restituição	2006	2008	SP	1	455		Bov	6 a 12	9.100	3	0,03%	ELISA/EITB	
16	Restituição	2006/2007	2008	Área interditada MS	1	444		Bov	6 a 12	7.986	219	2,74%	ELISA/EITB	
17	Restituição	2007	2008	Área interditada MS	1	245	611	Bov	6 a 12	5.681	168	2,96%	ELISA/EITB	
18	Restituição	2007	2008	Pantanal	1	300	482	Bov	6 a 12	11.537	133	1,15%	ELISA/EITB	
19	Restituição	2007	2008	Planalto	1	307	452	Bov	6 a 12	8.846	251	2,84%	ELISA/EITB	
20	Restituição	2007*	2011	Fronteira MS e Paraguai (zona de alta vigilância)	1	298	501	Bov	6 a 12	8.635	283	3,28%	ELISA/EITB	
21	Reconhecimento	2010	2011	Zona proteção BA	1	294			Bov	6 a 12	3.804	6	0,16%	ELISA/EITB
									PR	> 3	1.433	0	0,00%	VIAA-IDGA
22	Reconhecimento	2010	2011	Zona proteção TO	1	289		Bov	6 a 12	3.322	1	0,03%	ELISA/EITB	
23	Reconhecimento	2010	2011	Zona proteção RO	1	58		Bov	6 a 12	1.257	1	0,08%	ELISA/EITB	
24	Reconhecimento	2012/2013	2014	AL, CE, MA, PB, PE, PI, RN e parte do PA	5	1.756	1.942		Bov	6 a 24	48.840	27	0,06%	ELISA/EITB
									PR	> 3	9.888	103	1,04%	ELISA
25	Reconhecimento	2014/2015	2018	RR, AP, AM e partes do PA	5	910	1.103	Bov	6 a 24	19.225	67	0,35%	ELISA/EITB	
2017		3												162

* Na fronteira do MS com Paraguai, além do estudo realizado em 2007, foram realizados estudos longitudinais na zona de alta vigilância em 2008 e 2009
1. UPA = unidade primária de amostragem; 2. Prop. = propriedade rural; 3. Esp. = espécie (Bov = bovinos/bubalinos, PR = pequenos ruminantes)
4. Amostras referentes à primeira coleta (não estão incluídas amostras referentes às investigações complementares desencadeadas nas UPAs com pelo menos um animal soropositivo)
5. Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra PNEs. Dependendo de cada estudo, foram utilizados outros testes laboratoriais complementares, como teste de reação em cadeia da polimerase de transcrição inversa, em tempo real - RT-PCR, para amostras de líquido esofágico-faríngeo, ou teste de ELISA CFL (competição em fase líquida) para detecção de anticorpos estruturais em animais não vacinados.



- Item **1**: primeiro estudo epidemiológico conduzido pelo serviço veterinário oficial no Brasil (BRASIL, 1977, 1983)
- Item **2**: quadro caracteriza o período de maior produção científica sobre as teorias dos ecossistemas de febre aftosa e das “formas de organização da produção pecuária como determinantes de risco de febre aftosa”, destacando os estudos de caracterização geográfica:
- 2.1) trabalhos pioneiros de caracterização realizados nos estados de Santa Catarina (MARTINS et al., 1981) e do Rio Grande do Sul (ASTUDILLO et al., 1986);
- 2.2) trabalho de Mathias et al. (1981), apoiando a caracterização do Pantanal Matogrossense como ecossistema endêmico primário; e
- 2.3) período de intensa produção científica sobre a caracterização das formas de produção pecuária e a febre aftosa, com produção de teses de mestrado e doutorado na Escola de Veterinária da UFMG.
- Item **3**: estudo de avaliação de transmissão viral realizado no Pantanal Sul-matogrossense (MORAES et al., 1997)
- Item **4**: quadro destaca o período de concentração dos estudos de transmissão viral sobre a febre aftosa. Na parte superior estão apontados os estudos conduzidos com objetivo de apoiar o reconhecimento de zonas livres da doença, e na parte de baixo os estudos realizados para recuperação ou manutenção de status sanitário, incluindo atividades de vigilância, entre outros.
- 4.1) CPS = Circuito Pecuário Sul (ID 1, Tabela 1)
- 4.2) CPCO – MS = Circuito Pecuário Centro-Oeste, exceto Mato Grosso do Sul (ID 2, Tabela 1)
- 4.3) CPL + MS = Circuito Pecuário Leste, mais Mato Grosso do Sul (ID 3, Tabela 1)
- 4.4) RO = Rondônia (ID 6, Tabela 1)
- 4.5) AC + parte AM = Acre mais parte do Amazonas (ID 7, Tabela 1)
- 4.6) Região Sul do Estado do Pará (ID 8 e 9, Tabela 1)
- 4.7) SC = estudo para apoiar a certificação de Santa Catarina como zona livre sem vacinação (ID 10, Tabela 1)
- 4.8) Zona de proteção da Bahia, Rondônia e Tocantins (ID 21, 22 e 23, Tabela 1)
- 4.9) CPNE + parte PA = Circuito Pecuário Nordeste mais parte do Pará (ID 24, Tabela 1). Trabalho descrito no Capítulo 3 desta tese
- 4.10) AP, AM, RR + parte PA = Amapá, Amazonas, Roraima, mais parte do Pará (ID 25 e 26, Tabela 1). Trabalho descrito no Capítulo 5 desta tese
- 4.11) Restituição RS e SC (ID 4 e 5, Tabela 1). Dois estudos independentes em cada UF
- 4.12) Restituição MS, PR e SP (ID 11 a 20, Tabela 1). Sete estudos realizados em Mato Grosso do Sul, dois no Paraná e 1 em São Paulo
- 4.13) Estudo de coorte para avaliar a indução de anticorpos contra PNEs por vacinas contra a febre aftosa produzidas no Brasil
- 4.14) Estudo de transmissão viral na linha de fronteira internacional dos estados de MS, MT, RO e AC
- 4.15) Coleta de amostras para avaliação de transmissão viral durante as vacinações oficiais realizadas em parte do AM e no Amapá, nos anos de 2009, 2010 e 2011
- 4.16) Estudos de transmissão viral realizados em SC, zona de alta vigilância de MS e na zona livre com vacinação
- 4.17) Vigilância longitudinal realizada na zona de alta vigilância de MS
- 4.18) Estudo de transmissão viral na zona livre de febre aftosa com vacinação
- 4.19) Implantação de sistema de vigilância longitudinal no Estado de Santa Catarina, nos anos de 2016 e 2017
- Item **5**: Estudos de avaliação de imunidade contra a febre aftosa, iniciados em 2005 (5 estudos até 2017). Estudos não abordados neste documento.

Figura 08. Síntese histórica dos estudos epidemiológicos para febre aftosa realizados no Brasil, 1975 a 2017

Deve-se considerar, no caso de país ou zona livre de febre aftosa onde se aplica a vacinação, que o reconhecimento do status de livre da doença sempre representou um grande desafio para o serviço veterinário oficial, quando comparado a áreas onde a vacinação não é realizada. Isto, em parte, devido às dificuldades de se demonstrar a ausência do agente viral em rebanhos submetidos à vacinação massiva e sistemática. De um lado, a forte e constante pressão vacinal pode contribuir para revelar anticorpos contra PNEs do vírus da febre aftosa induzidos pela vacinação, dificultando a distinção entre animais infectados e animais vacinados. Por outro lado, falhas na vacinação ou na resposta à vacinação podem contribuir para ocorrência de bolsões de baixa imunidade populacional, possibilitando a persistência de transmissão viral com características e níveis de difícil detecção pelos sistemas locais de vigilância. Além destas questões, diretamente relacionadas com o uso da vacina, também devem ser consideradas as limitações dos testes laboratoriais utilizados para diferenciar animais infectados de animais vacinados, fato agravado no caso da febre aftosa, onde está demonstrada, laboratorialmente, a presença de “portadores”, ou de animais “persistentemente infectados”, apesar da questionável importância epidemiológica desta característica na difusão ou manutenção do agente viral em condições de campo.

Todas estas questões, como mencionado, demandaram intensas discussões no âmbito da OIE, refletidas nas constantes alterações das diretrizes e conceitos inseridos no Código Terrestre, relativos à condição de zona livre com vacinação. Conforme informado, esta categoria foi incluída no Código Terrestre apenas em sua 7ª edição, em 1998, seis anos após o reconhecimento pela OIE dos conceitos de zonificação e regionalização. Na mencionada edição, exclusivamente nas definições de país ou zona livre de febre aftosa com vacinação, foi inserida a condição de “*contar com um sistema de vigilância intensiva e periódica para detectar qualquer atividade viral*” (OIE, 1998, artigo 2.1.1.2, p. 73 e 76, tradução livre). A partir deste momento, diante da resistência de alguns países membros em reconhecer a condição de livre de febre aftosa com vacinação, várias alterações foram inseridas no Código Terrestre com respeito aos conceitos de infecção, de atividade viral e de circulação ou transmissão viral. Esta resistência foi alimentada, inclusive, pelas frequentes introduções da doença em zonas livres com vacinação reconhecidas pela OIE na região do Cone Sul, América do Sul, ao final da década de 1990 e início dos anos 2000, conforme discutido nos itens anteriores. Após 1998, as primeiras alterações substanciais no capítulo sobre a febre aftosa foram registradas na 11ª edição do Código Terrestre, de 2002, incluindo-se a definição de *infecção* para a doença (Artigo 2.1.1.1) e a inserção, nos artigos referentes a país ou zona livre sem vacinação e para país livre com vacinação, da condição de “*não ter detectado nenhum indício de infecção pelo vírus da febre aftosa nos 12 últimos meses*”, item ausente para a categoria de zona livre de febre aftosa com vacinação, o que, de certa forma, limitava a importância para este status

sanitário. No ano seguinte, com a 12ª edição do Código Terrestre, esta condição passou novamente a ser considerada para a categoria de zona livre com vacinação. Outra demonstração para o limitado uso esperado para a categoria de zona livre de febre aftosa com vacinação, foi a inclusão, a partir da 11ª edição do Código Terrestre, no *caput* do artigo 2.1.1.5., do seguinte texto: “*Um exemplo do estabelecimento deste tipo de zona são os casos em que é aplicada a vacinação preventiva em animais de zoológico, animais pertencentes a espécies ou raças pouco comuns, ou animais de centros de investigação, com finalidade de preservação*” (OIE, 2002, p. 89). Este exemplo foi retirado do Código Terrestre apenas em sua 15ª edição, de 2006.

Ainda em 2003, destaca-se a inclusão do Anexo 3.8.6 no Código Terrestre, intitulado “*Diretrizes preliminares para o reconhecimento ou a restituição do status de país ou zona livre de febre aftosa*”. Com respeito à condição de país ou zona livre com vacinação, as recomendações incluíram:

“Além das condições gerais, um País Membro que solicite o reconhecimento do status de país ou zona livre de febre aftosa com vacinação deverá apresentar provas da existência de um programa eficaz de vigilância da doença clínica e demonstrar que a febre aftosa não tem estado presente no país ou zona durante, pelo menos, nos últimos 2 anos. **Em complemento, a vigilância da infecção pelo vírus da febre aftosa deverá mostrar que o vírus não tem circulado na população vacinada nos últimos 12 meses.** Para este objetivo, será necessária uma vigilância sorológica que compreenda provas capazes de detectar a presença de anticorpos contra as PNEs, conforme descrito nas presentes diretrizes. Recomenda-se fornecer provas da eficácia do programa de vacinação” (OIE, 2003, p. 450).

As discussões sobre o reconhecimento do status de país ou zona livre de febre aftosa com vacinação seguiram nos anos seguintes, destacando-se o trecho abaixo, extraído do relatório final da reunião da Comissão Científica da OIE para doença dos animais, ocorrida em Paris, entre os dias 10 e 11 de março de 2004:

“A princípio, é estatisticamente impossível que algum país praticando a vacinação demonstre a ‘ausência de infecção’ em todo o seu território, ou em uma zona, para toda sua população, como exige o Capítulo 2.1.1 do Código Terrestre. Literalmente, isto suporia demonstrar que não há nem um só animal infectado em toda a população susceptível do país ou zona em questão. A única maneira de fazê-lo consistiria em coletar amostras de toda a população e aplicar-lhes uma prova perfeita. Na prática, é provável que não seja possível fazê-lo, por motivos tanto logísticos como econômicos. Aparentemente, o capítulo do Código Terrestre relativo à febre aftosa (2.1.1.), que exige a ausência da infecção, contrasta com o novo projeto de diretrizes para a vigilância da doença (Anexo 3.8.6.), que o Comitê Internacional estudará para sua aprovação em maio de 2004. Nas diretrizes, parece que estar livre de infecção equivale à ausência de circulação do vírus. Este enfoque conta com o apoio da Comissão Científica. Por conseguinte, propõe-se que os países que praticam a vacinação demonstrem a ausência de circulação do vírus no país ou zona mostrando que a infecção ocorre com uma frequência menor que a prevalência entre rebanhos e dentro de rebanhos adotada para a vigilância...” (OIE, 2004a, p. 1).

O entendimento da Comissão Científica da OIE prevaleceu entre os Países Membros da OIE, e na 13ª edição do Código Terrestre, de 2004, no Capítulo da Febre Aftosa, especificamente nos artigos referentes a país ou zona livre com vacinação, o termo “*infecção*” foi substituído pela expressão “*indício de circulação*”, incluindo-se a frase “...a doença e a circulação do vírus são objeto de vigilância...”. Na 14ª edição do Código Terrestre, de 2005, o Anexo sobre vigilância para febre aftosa foi atualizado e, no caso da condição de país ou zona livre com vacinação, também foi retirado o termo “*infecção*” e inserida a frase: “...a vigilância demonstrará que o vírus da febre aftosa não tem circulado nas populações susceptíveis (vacinadas e não vacinadas) nos últimos 12 meses” (OIE, 2005, p. 558, tradução livre).

As últimas alterações mais expressivas sobre o tema, foram registradas na 24ª edição do Código Terrestre, de 2015. De forma geral, com objetivo de manter um padrão de redação em todo o Código Terrestre, o termo “*circulação*” foi substituído por “*transmissão*”, termo este utilizado pela primeira vez na 5ª edição em inglês, de 1986, nas definições de “*política de stamping-out*” e na Seção 1.2, “*Notificação e Informação Epidemiológica*”, e na 6ª edição em espanhol, de 1992, na definição de “*Certificado zoossanitário internacional*”. No caso específico do Capítulo 8.8., intitulado “*Infecção pelo vírus da febre aftosa*”, registra-se a atualização e o melhor detalhamento da definição de infecção pelo agente viral (Artigo 8.8.1) e das condições para reconhecimento de país ou zona livre onde se aplica a vacinação (Artigo 8.8.3), destacando-se, entre os itens elencados, o seguinte trecho sobre o tema:

- [...]
- 3) apresentar provas documentais de que:
- a) foi realizada uma vigilância conforme nos Artigos 8.8.40. a 8.8.42., para detectar sinais clínicos de febre aftosa e demonstrar que não indícios de:
 - i) infecção pelo vírus da febre aftosa em animais não vacinados;
 - ii) transmissão do vírus da febre aftosa em animais vacinados;
- [...]” (OIE, 2015, v. 2, p. 498, tradução livre)

Desta forma, os estudos epidemiológicos conduzidos no Brasil, a partir de 1998, foram se adequando às diretrizes da OIE. De forma geral e resumida, a estratégia de diagnóstico utilizada nos estudos foi representada pelo uso de dois testes sorológicos em série, para detecção de animais com anticorpos contra PNEs, seguida de investigação epidemiológica no caso de resultados positivos como procedimento confirmatório para se obter a maior especificidade possível. Nos dois primeiros trabalhos conduzidos no país, referentes aos reconhecimentos obtidos em 1998 e 2000, foram utilizados, como teste de triagem, o ensaio VIAA-IDGA e, como teste confirmatório, a técnica EITB, ambos produzidos pelo PANAFTOSA. A partir do reconhecimento de 2000, o teste VIAA-IDGA foi substituído pela técnica I-ELISA 3ABC (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay), passando-se a utilizar o sistema I-ELISA 3ABC/EITB (BERGMANN et al., 2000).

Cada estudo envolveu realidades geográficas e sistemas de produção pecuária com características distintas. Entretanto, de forma geral, foi utilizada a seguinte estratégia de delineamento amostral: i) identificação de subpopulações para amostragem de acordo com as características ecológicas e produtivas; ii) em cada subpopulação identificada, execução de planos de amostragem independentes, do tipo de detecção realizado em duas etapas, a partir da seleção aleatória ou baseada em risco de propriedades rurais (unidades primárias de amostragem – UPAs) e, da seleção aleatória de bovinos ou bubalinos (unidades elementares de amostragem) em cada UPA selecionada; e iii) investigações complementares nas UPAs com pelo menos um animal soropositivo. Dependendo dos sistemas de produção pecuária predominantes nas localidades avaliadas, também foram incluídos pequenos ruminantes como unidades elementares de amostragem. Via de regra, o tamanho da amostra de UPAs e de unidades elementares em cada UPA foi determinado utilizando-se os seguintes parâmetros estatísticos e epidemiológicos: i) 90% a 95% de sensibilidade do sistema de diagnóstico; ii) 95% de sensibilidade agregada em nível de rebanho e de probabilidade de detecção de uma UPA infectada; iii) prevalência mínima variando de 0,5% a 1,0% de rebanhos (UPAs) infectados em áreas com vacinação e de 1,0% a 2,0% em áreas sem vacinação; e iv) prevalência mínima de bovinos ou bubalinos infectados em cada UPA avaliada variando de 5% a 10%, dependendo do tamanho do rebanho (BRASIL, 2017, 2016, 2013, 2007; GONÇALVES et al., 2003; MORAES et al., 2013). A realização dos estudos envolveu o estabelecimento de estruturas de controle apropriadas, incluindo equipes de coordenação e de campo, elaboração de manuais técnicos e formulários específicos, reuniões técnicas de treinamento para a padronização de ações e procedimentos, levantamento de informações epidemiológicas para cada propriedade e animal participante, e implantação de sistemas informatizados para controle do banco de dados de cada estudo. Na maioria dos estudos, as amostras foram coletadas em bovinos ou bubalinos de 6 a 24 meses de idade, subdivididos nas categorias de 6 a 12 meses, 13 a 18 meses e 19 a 24 meses. Todos os animais amostrados receberam identificação individual de longa duração e foram submetidos a inspeção clínica de boca e patas. As atividades de investigação complementar, conduzidas nas UPAs com pelo menos um bovino soropositivo, envolveram nova inspeção clínica dos animais amostrados, vistoria geral do rebanho, investigação das propriedades vinculadas por movimentação animal e coleta de novas amostras dos animais soropositivos e de outras espécies, quando disponíveis, incluindo líquido esofágico-faríngeo para pesquisa viral. A partir de 2005, seguindo as recomendações presentes no Anexo 3.8.7 do Código Terrestre, 14ª versão, foi incluída a coleta pareada nas UPAs com pelo menos um resultado soropositivo (recomendação “a”, item 2, Artigo 3.8.7.7, Código Terrestre, 14ª versão).

Além dos estudos de avaliação de transmissão viral, no Brasil, a partir de 2005, também foram implantados estudos de avaliação de eficiência da vacinação com objetivo de apoiar o gerenciamento do Programa nacional e atender demandas da OIE e de autoridades sanitárias de mercados internacionais. O primeiro estudo foi realizado nos estados da zona livre de febre aftosa com vacinação, no segundo semestre de 2005, contando com apoio do PANAFTOSA (BRASIL, 2007)⁷. Posteriormente, novos estudos para avaliação da eficiência da vacinação foram realizados nos estados componentes da zona livre de febre aftosa com vacinação nos anos de 2008, 2010 e 2014, e nos estados da Região Norte integrantes do último pleito brasileiro para reconhecimento de zona livre de febre aftosa com vacinação, em 2014.

Por fim, deve-se registrar a realização de dois estudos específicos conduzidos pelo MAPA, referentes aos testes para diferenciar animais infectados de animais vacinados, os denominados *DIVA tests (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals)*: i) estudo experimental, do tipo longitudinal, realizado em propriedades rurais localizadas na zona livre de febre aftosa com vacinação, no período de 2009 a 2011, com objetivo de avaliar a detecção de anticorpos contra proteínas não-estruturais do vírus da febre aftosa induzidos pela vacinação (identificado como item 4.13 na Figura 7); e ii) estudo de repetibilidade do teste ELISA 3ABC em laboratórios da rede oficial no Brasil, em amostras de soro sanguíneo coletadas nos estudos de avaliação de transmissão viral.

Condição zoossanitária para febre aftosa no Brasil, em 2018

A evolução geográfica e temporal da implantação de zonas livres da doença no Brasil, considerando maio como mês de referência (mês de realização da Assembleia Mundial de Delegados da OIE), está detalhada na Tabela 2 e demonstrada na Figura 9.

Como se observa, inicialmente, a implantação de zonas livres foi bastante aproximada aos espaços geográficos representados pelos circuitos pecuários definidos a partir de 1992, conforme discutido no item anterior deste documento. Diferenças mais significativas foram observadas em parte dos Estados do Circuito Pecuário Norte, devido à melhor compreensão dos sistemas de produção predominantes na região, fruto da disponibilidade de informações de melhor qualidade resultantes, em parte, do fortalecimento dos sistemas locais de defesa sanitária animal. Assim, Tocantins foi reconhecido como zona livre juntamente com o Circuito Pecuário Leste; Acre e Rondônia, mais áreas contíguas com o Amazonas, evoluíram de forma independente; e o Pará foi dividido em diferentes áreas epidemiológicas e avançou em dois momentos distintos.

⁷ Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/avaliacao-da-imunidade-populacional-resultante-das-campanhas-de-vacinacao-contra-a-febre-aftosa-2005-2006.pdf>>

Tabela 02. Síntese sobre a evolução da condição sanitária para febre aftosa no Brasil, segundo reconhecimento pela OIE

Ano (maio)	Ocorrência	Descrição
1998	Reconhecimento	Os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina são reconhecidos como zona livre de febre aftosa com vacinação
2000	Reconhecimento	Parte do Circuito Pecuário Centro-Oeste é reconhecido como zona livre de febre aftosa com vacinação (exceto Mato Grosso do Sul devido a foco de febre aftosa registrado em Naviraí, em 1999), ficando parte do Circuito Leste e Estado de Mato Grosso do Sul como zonas de proteção
2001	Reconhecimento	Circuito Pecuário Leste mais parte do Circuito Pecuário Centro-Oeste (incluindo Mato Grosso do Sul) são reconhecidos como zona livre de febre aftosa com vacinação, ficando o Estado de Rondônia e partes dos Estados da Bahia, Pará e Tocantins reconhecidos como zona de proteção
	Suspensão	Devido à reintrodução da febre aftosa em Jóia, Rio Grande do Sul, no mês de agosto de 2000, o status sanitário da zona livre com vacinação dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina foi suspenso. Nova reintrodução da febre aftosa foi registrada no Rio Grande do Sul a partir de maio de 2001
2002	Restituição	A condição sanitária de zona livre de febre aftosa com vacinação para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina foi restituída
2003	Reconhecimento	Estado de Rondônia é reconhecido como zona livre de febre aftosa com vacinação, incluindo zona de proteção em parte da fronteira com o Estado do Amazonas
2005	Reconhecimento	Estado do Acre mais municípios de Boca do Acre e do Guajará, localizados no Estado do Amazonas, são reconhecidos como zona livre de febre aftosa com vacinação
2006	Suspensão	Devido à reintrodução da febre aftosa nos Estados do Mato Grosso do Sul e do Paraná, a partir do mês de outubro de 2005, é suspenso o status sanitário dos Circuitos Pecuários Centro-Oeste e Leste
2007	Reconhecimento	Estado de Santa Catarina é reconhecido como zona livre sem vacinação
		Região Centro-Sul do Estado do Pará é reconhecida como zona livre de febre aftosa com vacinação
2008	Restituição	A condição sanitária de zona livre de febre aftosa com vacinação é restituída para os Circuitos Pecuários Centro-Oeste e Leste, incluindo implantação de zona de alta vigilância na fronteira entre Mato Grosso do Sul e Paraguai
2011	Restituição	Zona de alta vigilância implantada na fronteira do Estado do Mato Grosso do Sul com a República do Paraguai é considerada como zona livre de febre aftosa com vacinação
	Reconhecimento	Zonas de proteção localizadas nos Estados da Bahia, Rondônia e Tocantins são reconhecidas como zona livre de febre aftosa com vacinação, além de ampliação da zona livre no Estado de Rondônia
2014	Reconhecimento	Circuito Pecuário Nordeste mais parte do Estado do Pará são reconhecidos como zona livre de febre aftosa com vacinação, incluindo zonas de proteção implantadas no Estado do Pará
2018	Reconhecimento	Estados do Amapá, Amazonas, Roraima e zonas de proteção implantadas no Estado do Pará, são reconhecidos como zona livre de febre aftosa com vacinação

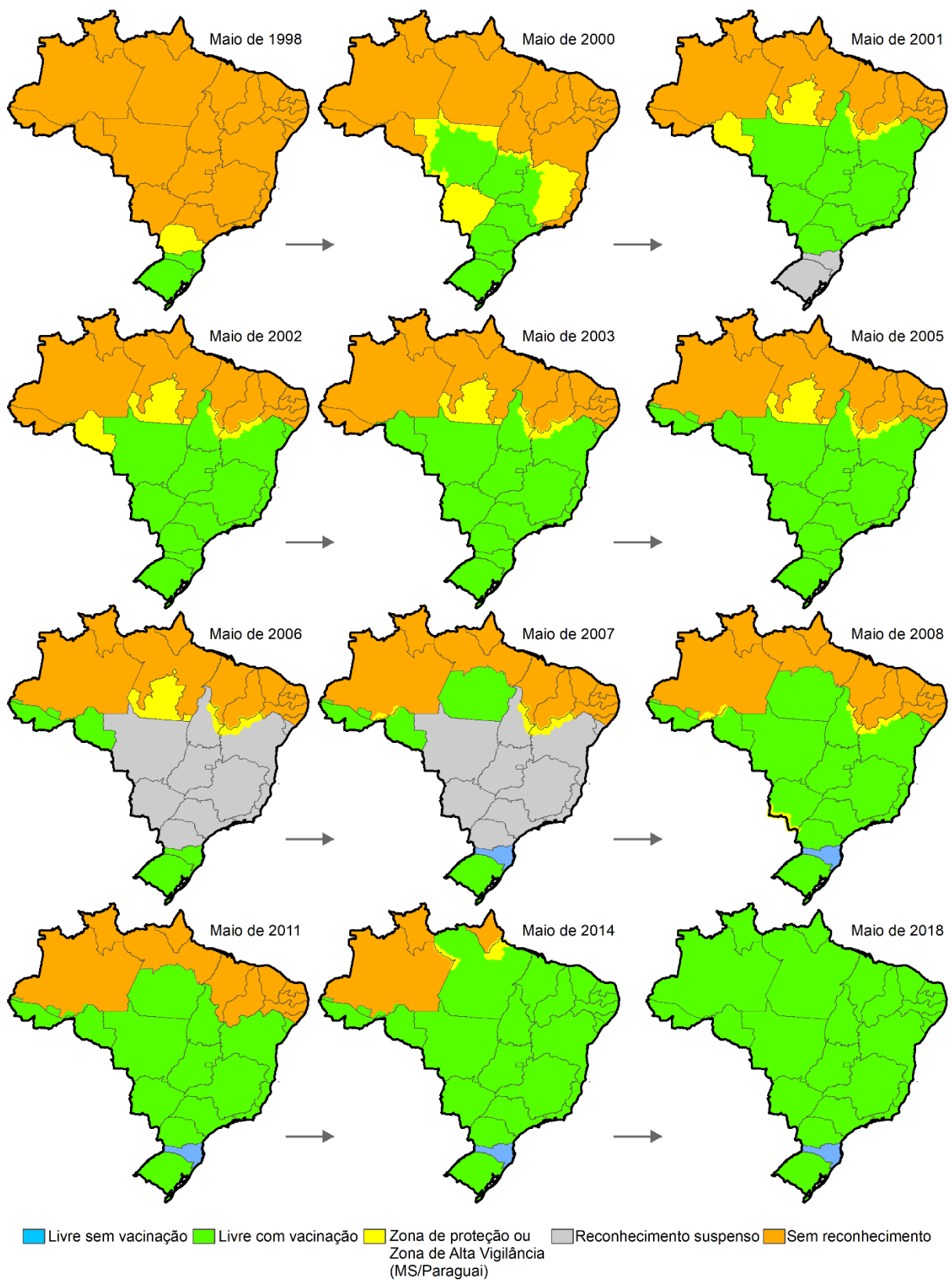


Figura 09. Evolução geográfica e temporal da implantação de zonas livres de febre aftosa no Brasil

Em maio de 2018, portanto, todo o território brasileiro passou a ser reconhecido pela OIE como livre de febre aftosa. O detalhamento da condição zoossanitária para a doença na América do Sul em 2018, segundo a OIE, está disponível na Figura 10. No caso do Brasil, o reconhecimento internacional está agrupado em quatro zonas livres da doença, sendo uma sem vacinação e três com vacinação. A zona livre sem vacinação está constituída pelo Estado de Santa Catarina, desde 2007, e as zonas livres com vacinação estão representadas: i) pelo Estado do Rio Grande do Sul; ii) pela fronteira internacional entre o Estado do Mato Grosso do Sul e a República do Paraguai; e iii) pelo restante do território nacional, formado por 24 unidades da Federação mais parte do Estado do Mato Grosso do Sul.

A partir deste momento, o país inicia novo ciclo de intervenção, com vistas a fortalecer os sistemas de vigilância e retirar gradativamente a vacinação contra a doença, tendo como referências o Guia Técnico de Trabalho para a última etapa do PHEFA (PANAFTOSA, 2017) e o Plano estratégico 2017 – 2026, elaborado sob coordenação do Departamento de Saúde Animal vinculado à Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA (BRASIL, 2017).

A perspectiva histórica aqui abordada, demonstra que a erradicação da febre aftosa no Brasil foi ancorada em planejamento estratégico que, por sua vez, esteve fundamentado por conhecimento e pensamento epidemiológico e por desenvolvimento científico e tecnológico, como novas vacinas e ferramentas de diagnóstico. Porém, o sucesso do combate à doença foi indissociável da forma como se institucionalizou o envolvimento da sociedade, em particular das cadeias produtivas pecuárias, permitindo que a ciência e a política caminhassem juntas durante um longo processo. O novo ciclo, iniciado em 2018 com o reconhecimento de todo o país como livre de febre aftosa, necessitará manter essas características, aprendendo com os sucessos e os reveses da história de luta contra a febre aftosa.

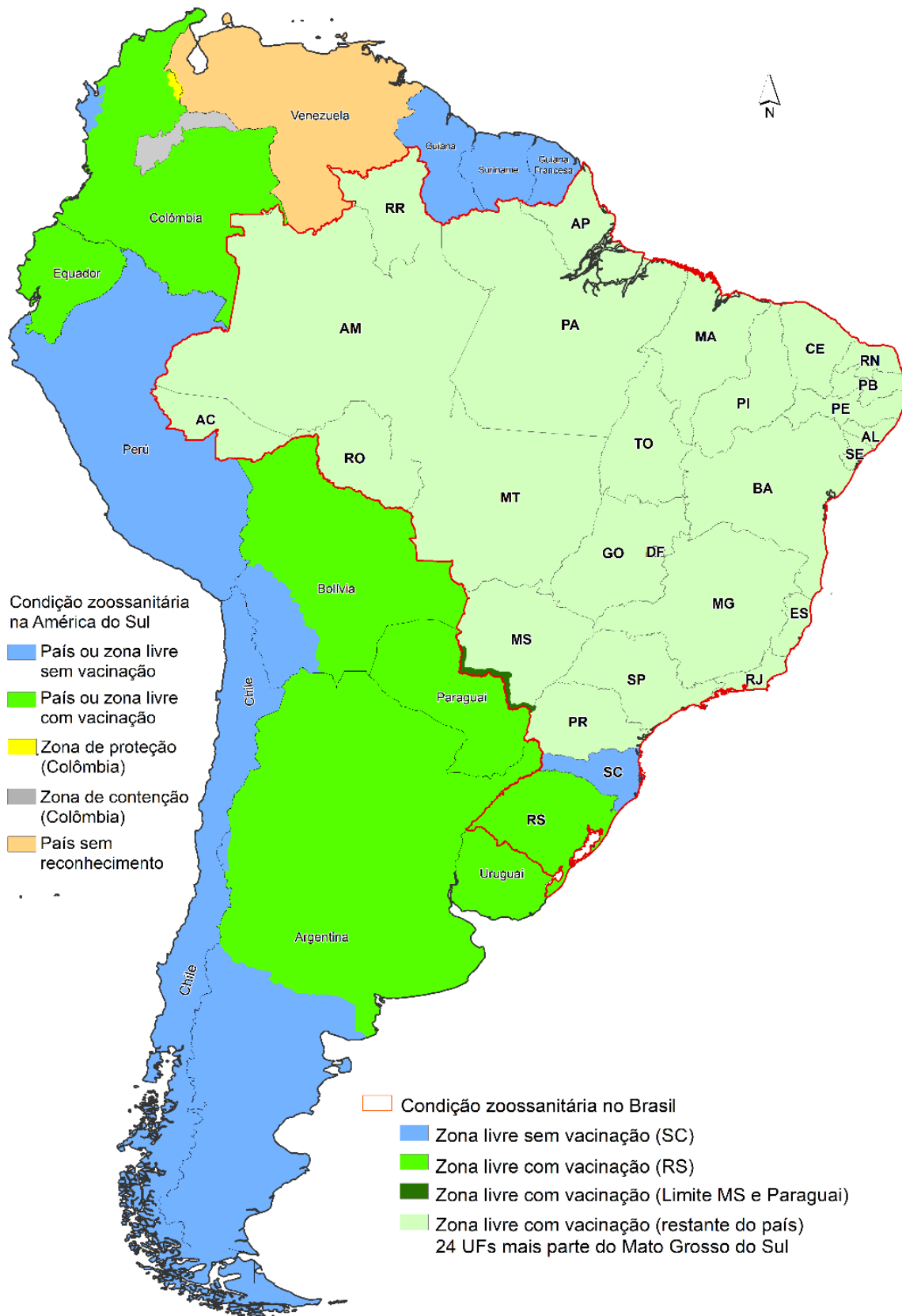


Figura 10. Condição zoossanitária para febre aftosa na América do Sul, segundo OIE, maio de 2018

Referências

- ALONSO A.; GOMES I.; BAHNEMANN H. G. (1988). La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 54, p. 51-54.
- ASTUDILLO. V.; DOEL, T. R.; VARELA-DIAZ, V.M. (1993). La importancia de PANAFIOSA en los programas de investigación desarrollo para el control y erradicación de la fiebre aftosa en las Américas. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 59, p. 3-9.
- ASTUDILLO, V. M. (1992). La fiebre aftosa en América del Sur. **A Hora Veterinária**, v. 12, n. 70, nov./dez., p. 16-23.
- ASTUDILLO, V. M. (1982). Sistema de información y vigilancia epidemiológica de las enfermedades vesiculares en las Américas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 1, n.1, p. 11-27.
- ASTUDILLO, V. M. ; DEPPERMAN, R. (1980). Sistema de informacion y vigilancia de las enfermedades del ganado. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 39-40, p. 3-16.
- ASTUDILLO, V., DORA, J.F., SILVA, A.J.M. (1986). Ecosistemas y estrategias regionales de control de la fiebre aftosa. Aplicación al caso de Rio Grande do Sul, Brasil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 52, p. 47-78.
- BARBOSA, H. V. Jr. (1994). **Análise da relação novilho/vaca como indicador da estrutura populacional para categorização dos tipos de produção pecuária - MG - 1960/1985**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 145 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).
- BERGMANN, I.E.; MALIRAT, V.; NEITZERT, E.; BECK, E.; PANIZZUTTI, N.; SANCHEZ, C.; FALCZUK, A. (2000). Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. **Arch Virol**; 145 (3): 473-89.
- BRANSCUM, A. J.; JOHNSON, W. O.; GARDNER, I. A. (2006). Sample size calculations for disease freedom and prevalence estimation surveys. **Statist. Med.** v. 25, p. 2658-2674.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 15, de 9 de março de 2018**. Ementa: Instituir o Sistema Nacional de Emergências Agropecuárias - SINEAGRO.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (2017). **Plano estratégico 2017 – 2026**, versão 1.0. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Saúde Animal, 2017. 83 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017). **Brazil's request to expand the FMD free zone where vaccination is practiced, proposal for recognition of the states of Amapá, Amazonas, Roraima and protection zones of the state of Pará as a FMD free zone where vaccination is practised**. Volume II: Annexes. Brasília, DF. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016). **Epidemiological study for evaluation of viral transmission in the FMD free zone with vaccination, 2014/2015, final report**. Brasília, DF. 17 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013). **Request for recognition of the states of Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, and the northern region of the state of Pará, as a FMD free zone with vaccination**. Brasília, DF. 73 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (2009). **Plano de ação para febre aftosa: atendimento à notificação de suspeita de doença vesicular, v. 1**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. 96 p.: il, color; 17 cm.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2007). **Report submitted to the World Animal Health Organization – OIE, proposing the recognition of the State of Santa Catarina as a FMD free zone where vaccination is not practised**. Brasília, DF. 46 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 44, de 2 de outubro de 2007**. Ementa: Aprovar as diretrizes gerais para a Erradicação e a Prevenção da Febre Aftosa a serem observadas em todo o Território Nacional, com vistas à implementação do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), conforme o estabelecido pelo Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (2007). **Avaliação da imunidade populacional resultante das campanhas de vacinação contra a febre aftosa: relatório final**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Saúde Animal, 2007. 61 p. Apoio: Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-americana de Saúde, Centro Pan-americano de Febre Aftosa.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 121, de 29 de março de 1993**. Ementa: Aprovar as Normas para o Combate à Febre Aftosa a serem observadas para o controle e a erradicação da febre aftosa em todo Território Nacional

BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal (1988). **As doenças dos animais no Brasil. Histórico das primeiras observações**. Brasília: SNAP/SDSA, 101 P. (Boletim de Defesa Sanitária Animal, número especial)

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal (1983). **Plano de controle e erradicação da febre aftosa – PNCFA: Segunda etapa – 1983/1987**. Brasília: Ministério da Agricultura.

BRASIL. Ministério da Agricultura (1981). Secretarias Estaduais de Agricultura. **Diagnóstico de Saúde Animal: Região Norte**. [S.l.]: Ministério da Agricultura, [1981].

BRASIL. Ministério da Agricultura (1977). Secretarias Estaduais de Agricultura. **Diagnóstico de Saúde Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura.

BRASIL. Ministério da Agricultura (1968). **Projeto de combate à febre aftosa: Etapa I – 1969/1972**. [S.l.]: SPL - Serviço de Planejamento - Engenheiros e Economistas Associados.

CAETANO JUNIOR, J. (1996). **Avaliação de risco nos focos de febre aftosa em bovinos: Minas Gerais, 1992 a 1994**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 68 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

CAMERON, A.R.; BALDOCK, F.C. (1998a). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, p. 1-17.

CAMERON, A.R.; BALDOCK, F.C. (1998b). Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, p. 19-30.

CAPORALE, V.; GIOVANNINI, A.; ZEPEDA, C. (2012). Surveillance strategies for foot and mouth disease to prove absence of disease and absence of viral circulation. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 31(3), p. 747-759.

COMISIÓN SUDAMERICANA PARA LA LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA – COSALFA (2010). **Resumen histórico de la COSALFA 1973-2010**. Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 45 p.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE FEBRE AFTOSA, 1. (1950). Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1950.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2014). **Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease**. FAO Animal Production and Health Manual n. 17. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-108637-7. 199 p.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2011). **A value chain approach to animal diseases risk management – Technical foundations and practical framework for field application**. Animal Production and Health Guidelines n. 4. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-106861-8. 140 p.

FIGUEIREDO, A. (1994). **A propósito do Boi**. Cuiabá : Editora da UFMT, 226 p. il. color. e mapas.

FROIS, M. C. M. (1995). **Caracterização das formas de organização da produção pecuária e das modalidades de ocorrência da Febre Aftosa nas mesorregiões homogêneas central mineira e oeste de Minas, 1980 a 1994**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 111 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

GARDNER, I. A.; STRYHN, H.; LIND, P.; COLLINS, M. T. (2000). Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 107-122.

GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, A. M.; MORAES, G. M. (2003). Random Sample Surveys Conducted in Brazil with a View to Substantiating the Expansion of the Free Zone of Foot-And-Mouth Disease where Vaccination is Practised. **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**. Available at www.sciquest.org.nz

GREINER, M. ; DEKKER, A. (2005). On the surveillance for animal diseases in small herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 70, p. 223-234.

HANSON, T. E. ; JOHNSON, W. O. ; GARDNER, I. A. ; GEORGIADIS, M. P. (2003). Determining the infection status of a herd. **Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics**. V. 8. N. 4, p 469-485.

HUMPHRY, R. W. ; CAMERON, A. ; GUNN, G. J. (2004). A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 65, p. 173-188.

IRRAZÁBAL, H.A.C. (2012). La red de control de la fiebre aftosa en el Cono Sur de Sudamérica : un ejemplo de gobernanza regional. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v.31, n. 2, p. 661-670.

JAYME, V. S. (1993). **Modalidades de organização de produção agropecuária e características epidemiológicas da febre aftosa nos estados de Tocantins e Goiás**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 272 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

LYRA, T. M. P. (2003). **A febre aftosa no Brasil: evolução e determinantes das políticas públicas de controle e erradicação, 1950-2002**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 130 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A (2004). A Febre Aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.565-57.

MADDARENA, E. F. (1991). **Redefinição das áreas endêmicas primárias da febre aftosa em Minas Gerais**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 70 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

MARTINS, C. (1984). **Caracterização epidemiológica da febre aftosa no espaço catarinense**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 122 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

MATHIAS, L. A, MOREIRA, C.E., ROSENBERG, F.J., OBIAGA, J.A. (1981). Estudio serológico de fiebre aftosa en bovinos procedentes del Pantanal Matogrossense, Brasil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 41-42, p. 3-8.

MELO, E. C. (2003). Foot-and-mouth disease in South America: the concept of the Pan-American Health Organization. **Foot-and-Mouth Disease: Control Strategies**. Symposium Proceedings 2 – 5 June 2002, Lyons. France. B. Dodet, M. Vicari, Eds. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. p. 73-79

MELO, E.C., SARAIVA, V., ASTUDILLO, V. (2002). Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 21, n. 3, p. 429-436

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, Secretaria de Defesa Agropecuária e Departamento de Saúde Animal (2017). **Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA, Plano Estratégico - 2017 – 2026**, Versão 1.0. Brasília: DF, julho de 2017, 83 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – MA, Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA, e Departamento de Defesa Animal – DDA (1950-1998). **Boletim de Defesa Sanitária Animal**. Vol. I – Ed. 1950-1998. Rio de Janeiro – Departamento de Defesa Animal, 1950. Vol. Trimestral. A partir de 1971, passou a ser editado em Brasília – DF. CDU 636.089. Triagem: 1600 exemplares. ISSN-0100-5855

MORAES, G.M., LOPES, P.L., COSTA, E.D.L., SANTOS, B.A., TEIXEIRA, R.C., CARLOS, N.C.A., GRISI FILHO, J.H. (2015). Estudo soroepidemiológico, baseado em risco, para avaliar circulação viral na área proposta para ampliação da zona livre de febre aftosa, 2013, Brasil. **Biológico**, 77(1), 66.

MORAES, G. M. (1993a). **Definição e delimitação dos circuitos de comercialização bovina como elemento metodológico de intervenção sanitária: o caso da febre aftosa no Estado de Mato Grosso do Sul**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 100 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

MORAES, G. M. (1993b). The bovine commercialization circuits as elements of sanitary intervention. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 59, p. 37-44.

MORAES, G. M., PAES, R. C. S., CAVALLERO, J. C. M. (1996-1997). Inquérito soroepidemiológico sobre febre aftosa realizado em bovinos no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 62-63, p. 21-33.

MOURÃO, M. L. P. (1994). **Sistema de organização da produção pecuária e ecossistemas de febre aftosa no norte de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 71 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

NARANJO, J., COSIVI O. (2013). Elimination of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. **Phil Trans R Soc B** 368: 20120381. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0381>

OBIAGA, J.A.; ROSEMBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M. (1979). Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecossistemas de fiebre aftosa. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, n. 33-34, p. 33-42, 1979.

OIE - World Organisation for Animal Health (2018). **Report of the meeting of the OIE Scientific commission for Animal Diseases**. Paris: 12-16 February. 174 p.

OIE - World Organisation for Animal Health. (2015). **Código sanitario para los animales terrestres**. Paris, France, 24^a ed., v. 1, 474 p., v. 2, 337 p. (ISBN 978-92-9044-974-4).

OIE - World Organisation for Animal Health. (2014). **Guide to terrestrial animal health surveillance**. 108 p. (ISBN 978-92-9044-842-6).

OIE - World Organisation for Animal Health. (2005). **Código sanitario para los animales terrestres**. Paris, France, 14^a ed., 688 p.

OIE - World Organisation for Animal Health (2004a). **Report of the meeting of the OIE Scientific commission for Animal Diseases**. Paris: 10-11 February. 27 p. (72 SG/12/CS3 D)

OIE - World Organisation for Animal Health. (2004b). **Terristrial Animal Health Code**. Paris, France, 13^a ed., 568 p.

OIE - World Organisation for Animal Health. (2003). **Código sanitario para los animales terrestres**. Paris, France, 12^a ed., 556 p.

OIE - World Organisation for Animal Health. (2002). **Código Zoosanitario Internacional de la OIE**. Paris, France, 11^a ed., 550 p.

OIE - Office International Des Epizooties. (1998). **International Animal Health Code, mammals, birds and bees**. Paris, France, 7^a ed., 507 p.

OIE - Office International Des Epizooties. (1992). **International Animal Health Code, mammals, birds and bees**. Paris, France, 6^a ed., 566 p.

OIE - Office International Des Epizooties. (1982). **International Zoo-sanitary Code: zoo-sanitary rules recommended by the OIE for international trade in animals and animal products**. Paris, France, 4^a ed., 407 p.

OIE - Office International Des Epizooties. (1976). **Código Zoosanitario Internacional: reglas zoosanitarias recomendadas por la OIE en los intercambios internacionales de animales y de productos animales**. Paris, France, 3^a ed., 394 p.

OIE - Office International Des Epizooties. (1968). **International Zoo-sanitary Code: zoo-sanitary rules recommended by the OIE on international trade in animals and animal products**. Paris, France, 1^a ed., 220 p.

OLASCOAGA, R. C. (2003). The history of foot-and-mouth disease control in South America. **Foot-and-Mouth Disease: Control Strategies**. Symposium Proceedings 2 – 5 June 2002, Lyons. B. Dodet, M. Vicari, Eds. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. p. 55-72

OLASCOAGA, R. C., GOMES, I., ROSENBERG, F. J., MELLO, P. A., ASTUDILLO, V., MAGALLANES, N. (1999). Fiebre Aftosa. São Paulo: Editora Atheneu. 458 p. (CDD-636.0896925)

OLASCOAGA, R. C. (1982). Sistema de información y vigilancia epidemiológica de las enfermedades vesiculares en las Américas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 1, n. 11, p.11-27.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organizacion Mundial de la Salud (1988). **Programa Hemisferico de Erradicacion de la Fiebre Aftosa em America del Sur: Plan de Accion**. I Reunion Comite Hemisferico para la Erradicacion de la Fiebre Aftosa. Washington, DC, 6-7 julio, 28 p.

PAGÉS, W. H. (1982). La importancia de las áreas libres de fiebre aftosa para los países importadores de productos y subproductos pecuários. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 1, n. 3, p. 741-756.

PANAFTOSA - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (2017a). Centro de Gestión del Conocimiento. **Catálogo de Publicaciones: PANAFOTOSA, 1951-julio 2017**. Rio de Janeiro: PANAFOTOSA-OPS/OMS, julio 2017. 52p.

PANAFTOSA - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (2017b). **Guia Técnica de Trabalho para a última etapa do Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa - PHEFA**. 2 ed. Rio de Janeiro: PANAFOTOSA – OPAS/OMS. 58 p. (Série de Manuais Técnicos, 19). ISSN 0101-6970.

PANAFTOSA - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1993). **Fundamentos básicos para la creacion y mantenimiento de areas libres de fiebre aftosa**. Rio de Janeiro: PANAFOTOSA – OPAS/OMS. 16 p.

PANAFTOSA - CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (1984). **Manual de procedimientos para preservar, ampliar y lograr areas libres de fiebre aftosa en America del Sur**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA – OPAS/OMS. 70 p. (Série de Manuais Técnicos, 7). ISSN 0101-6970.

PEREIRA, P. L. L. (1986). **Estudo do comportamento epidemiológico da febre aftosa no contexto pecuário do Triângulo Mineiro, MG**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 80 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

PROGRAMA HEMISFÉRICO DE ERRADICACIÓN DE LA FIEBRE AFTOSA - PHEFA. (2010) **Plan de Acción del PHEFA, 2011 – 2020**. Rio de Janeiro, Brasil: PANAFTOSA- OPS/OMS.

REVISÃO DA POLÍTICA E ESTRATÉGIAS DE COMBATE À FEBRE AFTOSA IMPLANTADAS PELO PROJETO DE CONTROLE DAS DOENÇAS DOS ANIMAIS. (1992). Elaboração: Grupo de Trabalho Criado pela Portaria N° 68, de 22 de julho de 1992, do Secretário Nacional de Defesa Agropecuária. Brasil, set., 1992.

ROSENBERG, F. J. (1977). **Principios de epidemiologia**. Rio de Janeiro: CPFA. (serie de manuales didacticos, 1). 89 p.

ROSENBERG, F. J. (1975). El conocimiento de la epidemiologia de la fiebre aftosa com particular referencia a Sudamerica. **Serie de monografias cientificas y técnicas n. 5**. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, RJ. 55 p. ISSN 0101-4897

ROSENBERG, F. J.; GOIC, R. M. (1973). Programas de control y prevencion de la fiebre aftosa en las Americas. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 1-22.

SERGEANT, E. S. G. (2018). Epitools epidemiological calculators. **Ausvet Pty Ltd**. Disponível em: <http://epitools.ausvet.com.au>.

SERRÃO, U. M. Programa Nacional de controle e erradicação da febre aftosa. **R. bra. Med. Vet.** v. 21, n. 6, p. 229-231, 1999.

SOUZA, J. G.; DÔLIVEIRA, C. F.D.; NOGUEIRA, J. M.; MACHADO, J. M.; FIGUEIREDO, V. C. F. **ACB do Programa Nacional de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA)**. Brasília: MAPA, 2008. 48 p.

SUTMOLLER, P., BARTELING, S.S., OLASCOAGA, R.C., Keith J. SUMPTION, K.J. (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. **Virus Research**, v. 91, p.101-144

TORRES, J. G. R; INZAURRALDE, A. L (1998). Erradicacion de la fiebre aftosa en las Américas. **R. bra. Med. Vet.** v. 20, n. 6, p. 230-231, 1998.

WESLEY, O. J.; SU, C.L; GARDNER, I. A.; CHRISTENSEN, R. (2003). Sample Size Calculations for surveys to substantiate freedom of populations from infectious agents. **Biometrics**. V. 60, p. 165-171.

WTO - World Trade Organization. (1995). **Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures**. World Trade Organization, https://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/15-sps.pdf

ZILLER, M.; SELHORST, T.; TEUFFERT, J; KRAMER, M.; SCHLÜTER, H. (2002). Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. **Preventive Veterinary Medicine**. V. 52, p. 333-343.

Capítulo 2

OS CIRCUITOS PECUÁRIOS E A FEBRE AFTOSA NO BRASIL: UMA ANÁLISE HISTÓRICO-INSTITUCIONAL

Geraldo Marcos de Moraes, Marlon Vinícius Brisola, Vitor Salvador Picão Gonçalves

Savannah J. Res. & Dev., v. 1, n.1, fevereiro, 2017

Recebido: 15/05/2015; Aceito: 10/10/2016; Publicado: 20/12/2016

Resumo

A febre aftosa representa ainda hoje importante ameaça econômica para os países produtores e exportadores de leite, couro, carnes e seus derivados das criações de bovinos, suínos, ovinos, caprinos e bubalinos. Considerando o Brasil detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo e de importantes criatórios de outros biungulados, a trajetória de seu controle, contudo, somente veio a demonstrar importantes avanços a partir da década de 1990. Tal sucesso, representado hoje por mais de 77% de seu território incluído na zona livre da doença, restando apenas três estados para que todo o país seja considerado livre, é resultado de avanços institucionais decorrentes de empenho público e movimentos público-privados. As motivações de tal empenho repercutiram em notáveis ações de complementaridade institucional entre atores diretamente envolvidos com as consequências da doença: pecuaristas, exportadores e representações governamentais responsáveis pelo controle sanitário no país e no continente latino-americano. Neste estudo, faz-se uma revisão histórica da evolução institucional em torno do combate à doença no Brasil e dos avanços a partir dele. Destacam-se, nesse contexto, as ações não promissoras do governo federal antes da década de 1970 e os progressos decorrentes das ações ocorridas sob a coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, com a participação ampla dos diferentes segmentos do setor agropecuário, a partir de 1990.

Palavras-chave: Instituições, Febre aftosa, Erradicação, Trajetória.

Introdução

O agronegócio brasileiro sustenta um mercado interno forte e uma balança comercial que gera mais de 100 bilhões de dólares a cada ano, conforme respaldam as estatísticas elaboradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Considerando as projeções do MAPA, tendo como referência o período de 2012/13 a 2022/23, a produção nacional aponta para garantia do abastecimento interno e para geração de excedentes exportáveis para algo em torno de 200 países. O complexo carne (aves, bovinos e suínos), em específico, revela potencial de crescimento de 34,9% no período avaliado, estando entre os produtos mais dinâmicos do agronegócio brasileiro. Quanto às exportações, as projeções também indicam quadro favorável para produção nacional, com elevadas taxas de crescimento para os três tipos de carnes analisadas. As carnes bovina e suína lideram as expectativas quanto ao crescimento das exportações, com taxas de 2,6% e 2,5% ao ano, respectivamente, enquanto para a carne de frango, a expectativa de crescimento anual é de 1,6%. (BRASIL, 2013a)

A conquista deste cenário favorável para o agronegócio brasileiro, especialmente a manutenção da produção pecuária no mercado internacional, depende, em grande parcela, da condição sanitária dos rebanhos comerciais do país e da capacidade de certificação sanitária por parte do serviço veterinário, com destaque para as ações de vigilância sobre a febre aftosa, inseridas no Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA. Essa trajetória pode ser registrada e avaliada por diferentes olhares e distintas abordagens. Como exemplo, destaca-se o Relatório Final sobre análise de custo/benefício do PNEFA, executada dentro do Projeto de Análise custo/benefício dos sistemas veterinários oficiais, coordenado pela Representação Regional para as Américas, da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (SOUZA et al., 2008). Neste trabalho, os autores avaliaram, sob o enfoque da viabilidade econômica, o período de 1970 a 2007, identificando três fases marcantes no combate à febre aftosa no Brasil: i) Fase 1: entre 1970 e o início dos anos oitenta, considerada como de gestação de uma efetiva ação de combate à doença; ii) Fase 2: compreendida entre o início dos anos oitenta e meados dos anos noventa, e correspondendo à transição para a maturidade das ações de combate; e iii) Fase 3: considerada a partir de meados dos anos noventa, representando a fase de consolidação do Programa. Além do resultado específico do estudo, que demonstrou os benefícios econômicos significativos do PNEFA, especialmente em termos de uma crescente participação da carne brasileira no mercado internacional, o trabalho apresenta-se como importante referencial histórico sobre atividades do país na luta contra a doença.

No caso específico da luta contra a febre aftosa, a participação das instituições e organizações apresenta-se de forma clara a partir da década de noventa, quando fica estabelecido o objetivo de erradicação da doença no país, por meio de um processo gradativo, baseado na criação de zonas livres da doença. Essa estratégia somente torna-se possível por meio da participação conjunta dos principais atores envolvidos, tendo as reuniões dos circuitos pecuários como espaços de encontro e de concertação.

Seguindo uma abordagem histórica sobre o combate contra a febre aftosa no Brasil, o presente levantamento tem como objetivo principal resgatar alguns elementos conceituais e históricos, com destaque para o referencial teórico constituído pelos ecossistemas da febre aftosa. Tal referencial apoia-se, conceitualmente, no contexto histórico-institucional em torno de Sistemas Agroindustriais (SAGs), conforme abordado por Brisola e Guimarães (2014).

Febre aftosa: importância econômica e trajetória institucional no Brasil

A febre aftosa constitui uma doença muito contagiosa, de curso agudo e que afeta os animais biungulados (casco com duas unhas), entre eles os bovinos, ovinos, caprinos e suínos. Apresenta baixa mortalidade e alta morbidade. O agente viral é mantido na natureza principalmente por meio da infecção em ruminantes, sendo identificados sete tipos distintos, dos quais apenas três foram registrados na América do Sul (OLASCOAGA et al., 1999).

Os principais sinais clínicos são caracterizados por febre e formação de vesículas, principalmente na cavidade bucal, focinho e espaços interdigitais. A transmissão ocorre pelo contato direto entre animais infectados e animais suscetíveis, e pelo contato direto de animais susceptíveis com objetos contaminados. Outras formas de transmissão são representadas pelo consumo de produtos cárneos ou lácteos contaminados e não submetidos a tratamento, especialmente pelos suínos; pela inseminação artificial com sêmen contaminado; e pela dispersão pelo vento de aerossóis infecciosos, especialmente em zonas temperadas (OLASCOAGA et al., 1999).

Representa uma das doenças dos animais cuja prevenção e combate empreendem os maiores recursos em todo o mundo e, talvez, seja a enfermidade dos animais mais importante em termos de impacto econômico (JAMES e RUSHTON, 2002). Sua importância deriva das implicações socioeconômicas oriundas de sua presença, principalmente no que diz respeito aos mercados internacionais de animais, produtos e subprodutos de origem animal, assim como pelos prejuízos diretos que ocasiona para a produção e produtividade pecuária e pelos custos públicos e privados motivados por sua prevenção, controle e erradicação. Estudo de perdas de

produção e produtividade em rebanhos com febre aftosa, conduzido no Brasil, no período de 1979 a 1982, apontou perda de 40% da produção em vacas leiteiras de 1 a 4 partos e de 22% em vacas leiteiras de 5 a 7 partos. Em rebanhos de corte, foram identificadas perdas no peso vivo variando entre 13 e 24%, principalmente em bovinos com menos de dois anos de idade (CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 1984, 1993).

Como exemplo dos gastos envolvidos no combate à doença, valores investidos no PNEFA, entre 2004 e 2013, variaram anualmente entre US\$ 148mil e US\$ 285mil para o setor privado e entre US\$ 141mil e US\$ 732mil, para o setor público. Os dados incluem despesas de investimento e custeio, atingindo o montante de US\$ 5,8 bilhões no período mencionado. A participação da iniciativa privada nestes investimentos gira em torno de 35%, considerando, em específico, os custos com aquisição e aplicação da vacina contra a febre aftosa (BRASIL, 2014).

Ainda de forma a caracterizar a importância da doença, informações sobre exportação anual de carne bovina (frescas, refrigeradas ou congeladas), no período de 1997 a 2013, para todo o país e em específico para Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul, onde foram registradas reintroduções da febre aftosa após reconhecimento de zona livre de febre aftosa com vacinação, revelam que em todos os Estados com ocorrência da doença observou-se imediata e expressiva queda nos valores de exportação anual nos anos seguintes aos focos. Considerando apenas a redução no valor exportado de carne bovina, no Mato Grosso do Sul, as perdas giraram em torno de de US\$ 236 milhões em 2006, enquanto no Rio Grande do Sul, a redução ficou em torno de US\$ 17 milhões em 2001, e no Paraná, em US\$ 64 milhões em 2006. Apesar das quedas observadas nos Estados com registro da doença, não foi registrado impacto no montante global exportado pelo país, devido à acomodação do mercado com ampliação da exportação por outras Unidades da Federação, não atingidas diretamente pela doença (BRASIL, 2014).

A introdução da febre aftosa na América do Sul deu-se em 1870, sendo descrita quase simultaneamente na Província de Buenos Aires, Argentina, na região central do Chile e no Uruguai. Essa primeira introdução ficou limitada à região do Cone Sul, consequente de importações de bovinos do continente europeu. No Brasil, o primeiro registro oficial da doença, em 1895, ocorreu na região do Triângulo Mineiro, também decorrente da importação de animais da Europa (OLASCOAGA et al., 1999; BRASIL, 1988).

As primeiras medidas oficiais e específicas de combate à doença no Brasil foram estabelecidas em 1919, com a publicação pelo MAPA do Código de Polícia Sanitária. Em 1921, devido à preocupação frente aos prejuízos ocasionados pela doença, promoveu-se a reestruturação e o aperfeiçoamento desse Código. Treze anos mais tarde, em 1934, o Governo Federal aprovou o Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, contendo medidas de profilaxia para a febre aftosa (Decreto nº 24.548, de 03/07/1934) (BRASIL, 1988).

Em 1951, em decorrência das propostas firmadas durante a I Conferência Nacional de Febre Aftosa, foi implantado um programa nacional de combate à doença, que não obteve resultados satisfatórios devido à carência de recursos financeiros e humanos, além de não se dispor de uma vacina eficiente. Naquele ano, também foi criado o Centro Pan-americano de Febre Aftosa – PANAFTOSA, em decorrência do reconhecimento da necessidade de ações conjuntas entre os países do Continente no combate à doença (TORRES e INZAURRALDE, 1998; SERRÃO, 1999).

Com base no Decreto nº 52.344, de 09/08/1963, o Governo Federal instituiu, no âmbito do Ministério da Agricultura, a Campanha Contra a Febre Aftosa - CCFA, constituindo equipe técnica para a sua gestão. Dois anos depois, em 1965, foi implantado o Programa de Combate à Febre Aftosa no Rio Grande do Sul. No ano seguinte, o programa foi estendido aos demais Estados do Sul e Sudeste, além de Bahia, Mato Grosso, Goiás e Sergipe.

Paralelamente, em 1968, foi contraído empréstimo junto ao Banco Interamericano de Desenvolvimento – BID, para financiamento do então Projeto Nacional de Combate à Febre Aftosa, em três etapas. A primeira etapa, utilizando recursos provenientes do financiamento, desenvolveu-se no período de 1972 a 1975; a segunda, realizada no período de 1975 a 1977, utilizou recursos de fundos nacionais e incorporou os Programas de Raiva dos Herbívoros e Brucelose Bovina. A terceira etapa foi desenvolvida no período de 1977 a 1982. (SERRÃO, 1999; LYRA e SILVA, 2004).

Avanços institucionais no controle da febre aftosa pós 1960

As décadas de 60 e 70 são consideradas marco histórico na área de conhecimento da saúde na América do Sul. No campo da saúde animal, a luta contra a febre aftosa apresentou-se como exemplo de evolução da forma de pensar e atuar sobre o processo saúde-doença, contribuindo na busca de metodologia e indicadores que permitam compreender a dinâmica deste processo em um contexto global (MORAES, 1993). Neste aspecto, o período foi marcado pelo questionamento aos programas de controle e prevenção da febre aftosa na América do Sul, considerados funcionalistas e adotando enfoque uniforme e rígido, não permitindo resultados consistentes, conforme assinalado por Rosemberg e Goic (1973). Esses autores propuseram, como alternativa, mudanças estratégicas baseadas nos ecossistemas da doença, constituindo na estratificação regional e temporal da febre aftosa, de maneira a permitir ações e alternativas operacionais diferenciadas. Nesta mesma linha, e considerando pouco eficiente abordar os problemas de forma isolada do contexto onde se produzem e se encontram os fatores que os determinam, Astudillo (1976) introduziu um enfoque sistêmico aos fenômenos complexos da saúde animal, acreditando na sua natureza integradora e como possibilidade de linguagem comum para uma ação multidisciplinar.

Baseado no conceito ecológico de doença, Rosemberg (1977) aprofundou a análise dos ecossistemas e generalizou sua aplicação para doenças infecciosas de curso agudo. Os ecossistemas, entendidos como sistemas de interações e associações causais, possuem características bem definidas entre os seus elementos, e podem ser considerados como a integração de três categorias: o agente, o hospedeiro e o ambiente.

Procurando complementar o enfoque predominantemente biológico dos ecossistemas, Obiaga, Rosemberg e Astudillo (1979) promoveram um grande avanço ao agregar a este considerações sobre a estrutura da produção pecuária. Os autores definiram quatro tipos de atividades econômicas da bovinocultura na América Latina, caracterizando o comportamento das populações susceptíveis e, conseqüentemente, determinando os ecossistemas de febre aftosa: economia pecuária extrativa; economia mista de transformação para carne; economia de transformação para leite; e economia mercantil simples.

A revisão dos processos de abordagem e intervenção no controle à febre aftosa, o desenvolvimento de tecnologias como vacinas de melhor qualidade e a implantação de sistemas de informação para registro e apoio às atividades de controle, caracterizam-se como importantes inovações na área da defesa sanitária animal e do sistema de produção pecuária construídas especialmente na década de 70. A referida inovação, entendida de acordo com definição apresentada por Bin e Paulino (2004), fundamenta e estabelece as bases para o avanço nas décadas seguintes de ações que estruturam a luta contra a doença na América do Sul (NARANJO e COSIVI, 2013).

Neste âmbito, o contexto institucional levanta importante representatividade. A construção institucional desenvolvida pela sociedade, e as interações entre o público e o privado, permitem maior alcance e eficácia dos propósitos governamentais, em diferentes tempos. No caso do combate à febre aftosa, as evidências pós anos 1970 destacaram tal assertividade.

A globalização iniciada neste período gerou de forma muito intensa uma corrente de intercâmbio comercial e produtivo entre países. Neste contexto, destaca-se a criação da Organização Mundial do Comércio - OMC, em 1986, responsável pela proposição de padrões e pela harmonização das regras a serem aplicadas no comércio internacional, incluindo as questões sanitárias que passaram a ocupar papel relevante no intercâmbio entre países ou blocos comerciais, fundamentado especialmente no Acordo sobre Medidas Sanitárias e Fitossanitárias firmado em 1995. Porém, segundo Morais et al. (2012), com a entrada em vigor das novas regras comerciais advindas dos acordos comerciais regulados pela OMC, impôs-se aos países exportadores, um enorme desafio de se buscar as estruturas e capacitações técnicas e científicas necessárias para realizarem as certificações de saúde animal e pública.

Na área do intercâmbio de produtos de origem animal, destaca-se a participação da OIE, que passa a desempenhar papel de referência para a OMC em questões de saúde animal, definindo padrões técnicos e científicos que devem ser observados, tanto pelos países importadores como exportadores, com o objetivo de evitar a disseminação de doenças, assim como prevenir, controlar e erradicar as doenças existentes. Particular atenção deve ser dada à incorporação nas normas da Organização Internacional de Saúde Animal - OIE do conceito de regionalização e zonificação, a partir de meados da década de oitenta (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2015). Até então, quando se procedia à avaliação da condição zoossanitária de um país com vista à exportação de animais ou produtos de origem animal, julgava-se o país como um todo. Confirmando-se a presença de uma doença infecciosa dentro das fronteiras de um país, todo referido país era considerado infectado. A partir da introdução dos conceitos de regionalização e zonificação, passou-se a permitir aos países administrar áreas livres e infectadas dentro de seus limites territoriais. Inicialmente, uma **zona** foi definida como parte de um país delimitada para efeitos de controle zoossanitário, e **região** como um conjunto de países ou de partes de países contíguos, delimitada para efeitos de controle zoossanitário. O conceito de região foi mantido pela OIE até 1999, passando, nos anos seguintes, a considerar **região** e **zona** como sinônimos, ou seja, o conceito de regionalização ou zonificação passou a ser considerado apenas para os limites geográficos de um determinado país. Atualmente, entende-se por **zona/região** como uma parte de um país, detentora de uma subpopulação animal e de particularidades sanitárias em relação a uma enfermidade, onde se aplicam medidas específicas de vigilância, controle e biossegurança, conforme exigências internacionais (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2014).

A possibilidade de regionalização/zonificação das doenças dos animais abriu novas perspectivas para países de dimensões geográficas continentais, como o Brasil. As novas perspectivas de combate à doença, e em especial as possibilidades de ampliar os mercados de exportação para os produtos de origem animal, fizeram com que os países da América do Sul, incluindo o Brasil, implantassem alterações nos programas nacionais de luta contra a febre aftosa. Nesse sentido, o PANAFTOSA, em conjunto com um grupo de especialistas dos diferentes países, elaborou o esboço de um Plano de Ação 1988-2009, que foi aprovado pela COHEFA em 1988 e ratificado pela RIMSA em 1989. O plano foi usado para orientar os esforços para combate à febre aftosa no continente, definindo como objetivo sua erradicação até 2009. Os pontos estratégicos da abordagem foram: uso da caracterização epidemiológica da doença em relação aos sistemas de produção para priorizar intervenções; esforço conjunto dos setores público e privado; desenvolvimento de iniciativas e planos sub-regionais; e estabelecimento de acordos bilaterais e multilaterais nas sub-regiões. A base técnica e epidemiológica do plano de ação foi fundamentada no amplo conhecimento sobre a história natural da doença e seus determinantes, particularmente as implicações dos sistemas de produção animal para a epidemiologia da doença, além da análise dos processos de saúde-doença feita pela abordagem de ecossistemas desenvolvido pelo PANAFTOSA nas décadas anteriores. (CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 2011)

Como consequência do PHEFA, o Brasil criou um Conselho Consultivo do Projeto de Controle das Doenças Animais, para reformulação das diretrizes e normas do Programa Nacional de febre aftosa. Esse Conselho contou com a participação de diferentes organizações com destaque para: Sociedade Rural Brasileira, Associação de Criadores de Zebu, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos Para Saúde Animal, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, Comissão de Agricultura e Política Rural da Câmara Federal, ABIEC, Federação das Cooperativas de Carnes, PANAFTOSA, Organização das Cooperativas Brasileiras, Conselho Nacional da Pecuária de Corte, Sindicato Nacional das Empresas de Leilão Rural e Fórum Nacional dos Secretários de Agricultura. Os resultados das atividades conduzidas por esse Conselho Consultivo foram publicados em 1992, levando à reformulação da política de combate à febre aftosa no País. A reformulação apresentou-se em três pontos principais: i) mudança da política de controle da doença para a de erradicação; ii) substituição da estratégia de se trabalhar isoladamente por estados, passando-se a trabalhar por circuitos pecuários; e iii) maior envolvimento de toda a cadeia produtiva nas diversas etapas do Programa: planejamento, execução, avaliação e financiamento (REVISÃO..., 1992).

A delimitação dos circuitos pecuários, em particular, consistiu na identificação de espaços geográficos distintos com certa independência no que se refere ao comércio e trânsito de animais e de seus produtos de risco para febre aftosa. Portanto, os circuitos pecuários referiram-se a regiões de economia pecuária relativamente independentes com grande probabilidade de absorção de todas as fases de produção da bovinocultura (cria, recria, engorda e abate). Ao final, foram estabelecidos cinco circuitos pecuários, conforme apresentado na Figura 1, considerando principalmente: estudo de séries históricas sobre o trânsito de animais; conhecimento local de profissionais e produtores; e avaliação dos sistemas de produção predominantes em cada região.

A estratégia de regionalização das ações de combate à febre aftosa, levando a implantação de espaços geográficos com distintas condições zoossanitárias no país, implicou na adoção de medidas restritivas de comercialização da produção pecuária entre as unidades da Federação e, em alguns casos, até mesmo dentro dos limites estaduais. Portanto, a implantação da referida estratégia somente foi possível a partir do entendimento amplo entre os principais setores envolvidos, o que foi construído por meio de reuniões dos circuitos pecuários, implantadas a partir de 1993. Nessas reuniões, ocorridas sob a coordenação do MAPA e participação ampla dos diferentes seguimentos do setor agropecuário, eram acordadas as principais normas e condutas envolvendo o processo de implantação das zonas livres de febre aftosa. Foram conduzidas até o ano de 2004, um total de 34 reuniões envolvendo mais de 2.300 participantes.

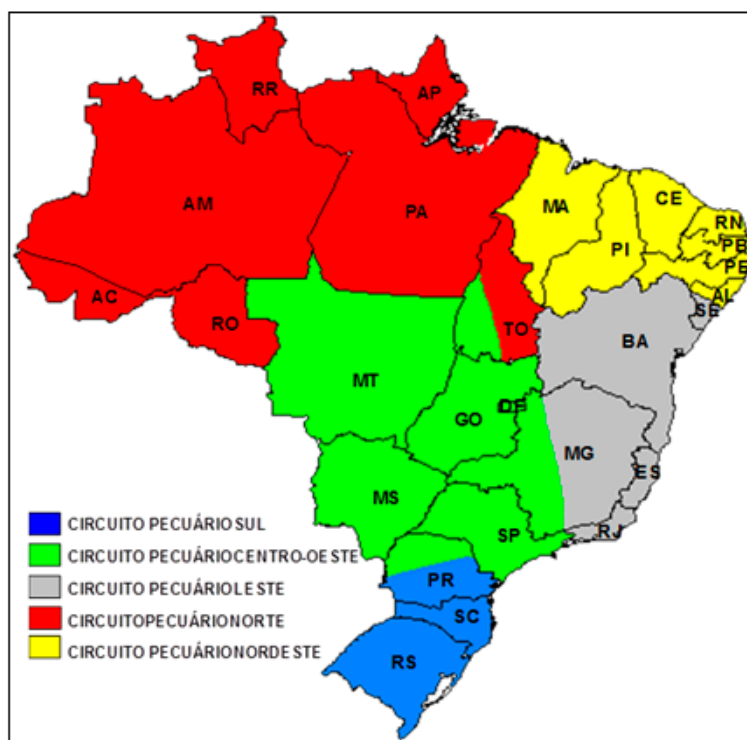


Figura 01. Definição dos circuitos pecuários
Fonte: Brasil (2014)

A realização dessas reuniões permitiu a adoção da estratégia gradativa de implantação de zonas livres da doença, obtendo-se o primeiro resultado em 1998, com reconhecimento internacional da zona livre de febre aftosa, com vacinação, constituída pelas unidades federativas do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, representando 8% da população bovina do país. O processo continuou nos anos seguintes, envolvendo ampla participação social e forte estruturação do sistema nacional de defesa sanitária animal, permitindo ao país chegar a 2005, 11 anos após o início das reuniões dos circuitos pecuários, com 71% da população bovina incluída na zona livre de febre aftosa. Neste mesmo ano, as reuniões dos circuitos foram interrompidas e o processo de implantação de zonas livres foi sendo conduzido de forma mais lenta, envolvendo as regiões do país com menor expressão no sistema agroprodutivo da bovinocultura. O último processo de implantação de zona livre com vacinação foi reconhecido em maio de 2014 pela OIE, envolvendo parte dos estados das Regiões Nordeste e Norte.

Atualmente, encontra-se em vigor o novo Plano de Ação do Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa, aprovado na 38ª Reunião da COSALFA, realizada em abril de 2011, em Recife, PE, com as seguintes metas para o período de 2011 a 2020, para toda a América do Sul (CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, 2011):

- a) Nos territórios com doença endêmica, ao final do período, alcançar a condição de livre com vacinação;
- b) Nos territórios livres com vacinação, ao final do período, obter o reconhecimento de livre sem vacinação na maioria de seus territórios nos quais tenha sido avaliada a factibilidade epidemiológica, econômica e institucional da suspensão da vacinação; e
- c) Nos territórios livres sem vacinação, ao final do período, preservar sua condição de livre e fortalecer os mecanismos de vigilância, prevenção e detecção precoce e resposta oportuna contra a doença.

A condição zoossanitária atual do país para febre aftosa pode ser avaliada na Figura 2.



Figura 02. Condição atual para febre aftosa
Fonte: Brasil (2014)

No caso específico do Brasil, os maiores esforços de momento, relacionados ao PNEFA, concentram-se na implantação da zona livre nos Estados do Amapá, Amazonas e Roraima, com perspectiva de reconhecimento internacional de país livre de febre aftosa a partir de 2018.

Paralelamente, o PNEFA passa por novo processo de revisão, com criação de Grupo de Trabalho com objetivo de definir as novas bases e estratégias do programa, visando fortalecer a vigilância e prevenção da febre aftosa no Brasil (BRASIL, 2013b). O Grupo ainda está limitado a representantes do setor público, cujo maior desafio será mobilizar esforços para reconstituir o favorável cenário institucional observado nos anos de 1993 a 2004, que sustentou rápido avanço na incorporação de zonas livres, em especial nos anos de 1998 a 2005.

A nova meta, que prevê o fortalecimento das ações de vigilância e prevenção e pela suspensão da vacinação contra a febre aftosa no país, envolve questões técnicas complexas que devem ser avaliadas do ponto de vista econômico e social, considerando os riscos decorrentes da vulnerabilidade da região. Necessariamente, deverá ser um trabalho compartilhado entre os setores envolvidos, buscando-se entendimentos, compromissos e participação fundamentais para levar, e manter, o país a uma “invejada” condição de livre de febre aftosa sem vacinação.

A importância do amparo institucional no controle da febre aftosa

Mediante o exposto acima, pode-se admitir que a implantação e execução do PNEFA representa uma rica história para o sistema brasileiro de defesa sanitária animal, que tem no combate à febre aftosa as bases fundamentais para sua estruturação e organização. A luta organizada contra a doença no Brasil, envolvendo ações coletivas coordenadas pelo Estado, remonta ao início da década de 1960, podendo-se considerar a instituição como marco oficial, no âmbito do MAPA, por meio da Campanha Contra a Febre Aftosa – CCFA, mediante o Decreto Presidencial nº 52.344, de 09/08/1963. Nesses 50 anos de combate à doença, muito conhecimento foi produzido e muitas ações realizadas, permitindo ao Brasil chegar, ao final do primeiro semestre de 2014, com 77% do seu território reconhecido internacionalmente como livre de febre aftosa, envolvendo 25 unidades da Federação e representando 99% do rebanho pecuário susceptível à doença (BRASIL, 2014).

Nessa trajetória de luta contra a doença, diferentes fases foram registradas, partindo de um modelo de atenção zoossanitária desenvolvimentista, construído sob o paradigma do Estado benfeitor e paternalista, chegando a uma gestão compartilhada, envolvendo responsabilidades acordadas entre setores público e privado (ASTUDILLO, 2012).

O combate à doença evoluiu, por conseguinte, de uma visão de controle (convivência com a doença), dominante até meados dos anos oitenta, para o objetivo da erradicação (eliminação da doença), sustentada na participação social – referendado por instituições fortes oriundas do interesse da sociedade produtiva, no caso.

Segundo Nin e Shmite (2013), as instituições, em específico, através da aplicação de legislações e normas, organizam as relações entre os cidadãos e regulam os vínculos entre estes e o Estado, representando o eixo da organização política, social e econômica de um dado território. Partindo-se dessa lógica, remete-se à perspectiva institucional defendida por Brisola e Guimarães (2014), que alentam para o fato de que o sucesso estratégico dos SAGs ou de um dado território integrado está diretamente associado ao plano relacional e institucional dos agentes envolvidos. Para estes autores, a compreensão sobre alguma “característica social, política ou econômica de um determinado SAG, passa pela identificação das peculiaridades inerentes ao território (ou territórios) em que os atores que o compõem atuam e pelas instituições que determinam sua existência e o seu funcionamento” (p. 3). Neste sentido, entender o grau de sucesso das medidas de controle e erradicação da febre aftosa está diretamente relacionado ao arranjo institucional informal e formal pelo qual os atores privados e públicos se submeteram a alcançar.

Para Campbell (2011, p. 2), a complementaridade institucional representa “a interdependência da influência institucional no comportamento das pessoas”. Ainda para este autor, “quanto maior o grau de complementaridade institucional, maior será a performance econômica de um país”. São as mudanças e as complementaridades institucionais ocorridas na trajetória de uma determinada sociedade (organização ou sistema) que favorece o entendimento sobre, por exemplo, a eficiência de uma certa estratégia competitiva em um determinado território ou Sistema Agroindustrial (BRISOLA e GUIMARÃES, 2014).

Nesse sentido, as importantes evoluções na luta contra a febre aftosa nos anos vindouros serão sustentadas pelas inovações tecnológicas e pela organização institucional ocorridas nas décadas anteriores e impulsionadas pela demanda crescente de alimentos proteicos. Os desafios mudarão, dado que uma vez declarado todo o território nacional livre de febre aftosa, a retirada progressiva da vacinação levará à intensificação de sistemas de vigilância epidemiológica visando a manutenção da condição sanitária adquirida. O fato de uma política pública ancorada em um bem privado (vacinação) passar a depender de um bem público (vigilância), exigirá novas soluções que passam por adaptações dos arranjos institucionais que contribuíram para o sucesso do programa de erradicação da febre aftosa. Tais movimentos foram e serão, portanto, consequências de ações de complementaridade institucional ocorridas no Brasil e no mundo, e que favorecerão ao controle e erradicação definitiva da doença.

Referências

ASTUDILLO, V. M. **Revisão do PNEFA. As organizações de saúde animal do Brasil que aprendem: estratégia educativa.** Trabalho de consultoria apresentado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, dentro da proposta de revisão das bases conceituais e estratégias do PNEFA. Brasília: MAPA, 2012. 10 p.

ASTUDILLO, V. M. **Metodologia para la solucion de problemas:** una introduccion al analisis de sistemas en salud animal. Rio de Janeiro: CPFA. 1976. (serie de manuales didacticos, 4). 35 p.

BIN, A.; PAULINO, S. R. Inovação e meio ambiente na pesquisa agrícola. In: ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA EM AMBIENTE E SOCIEDADE, 2, 2004, Indaiatuba. **Anais...** Indaiatuba: Associação Nacional de Pós Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade, 2004. 19 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Relatório Anual do Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa – PNEFA.** Brasília: MAPA, 2014. 10 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Projeções do Agronegócio – Brasil 2012/13 a 2022/23:** projeções de longo prazo. Brasília: MAPA, 2013a. 98 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Portaria nº 24, de 6 de fevereiro de 2013**. Cria Grupo de Trabalho para revisão do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa - PNEFA, definindo as novas bases e estratégias do programa, visando fortalecer a vigilância e prevenção da Febre Aftosa no Brasil. 2013b Disponível em: <[http:// sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/)>. Acesso em 22 out. 2014. 1 p.

BRASIL, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, número especial. Brasília: SNAP/SDSA, 1988. 101 p.

BRISOLA, M. V.; GUIMARÃES, M. C. Redes e desenvolvimento territorial: uma proposta de análise histórico-comparativa aplicada a sistemas agroindustriais. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HISTORIA ECONÔMICA, 4, 2014, Bogotá. **Anais...** Bogotá: Asociación Colombiana de Historia Económica, 2014. 18 p.

CAMPBELL, J. L. The US financial crisis: lessons for theories of institutional complementarity. **Socio-Economic Review**, New York, v. 2, n. 9, p. 211-234, jan. 2011.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA – PANAFTOSA. **Programa Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa – PHEFA**: plano de acción 2011-2020. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 2011.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA – PANAFTOSA. **Consecuencias econômico-sociales de la erradicacion de la fiebre aftosa**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 1993.

CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA – PANAFTOSA. Banco Interamericano de Desarrollo. **Estudio de pérdidas de producción y productividad en ganado con fiebre aftosa**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA, 1984.

JAMES, A. D.; J. RUSHTON, J. The economics of foot and mouth disease. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 21 (3), P. 637-644, 2002.

LYRA, T.M.P.; SILVA, J.A. A Febre Aftosa no Brasil, 1960-2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.565-576, 2004.

MORAES, G. M. Los circuitos de comercialización bovina como elementos de intervención sanitaria. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**. v. 59, p. 29-36, 1993.

MORAIS, N. A.; BARBOSA, H. V. B.; SOUZA, J. G. Pecuária e Saúde Animal. **Revista UFG/Universidade Federal de Goiás. Pró-Reitoria de Extensão e Cultura**. Ano XIII, n. 13, p. 24-30, 2012.

NARANJO J.; COSIVI O. Elimination of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v368, n. 20120381, 2013. Acesso em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0381>>. Disponível em: 15 set. 2014.

NIN, M.C.; SHMITE, S. M. Las instituciones vinculadas con el mercado de carne bovina: articulaciones multiescalares; una mirada geográfica. **Revista Universitaria de Geografía**, v.22, n. 1-2, p. 69-100, 2013.

OBIAGA, J.A.; ROSEMBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M. Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecosistemas de fiebre aftosa. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, n. 33-34, p. 33-42, 1979.

OLASCOAGA, R.C.; GOMES I.; ROSENBERG, F.J.; DE MELLO, P. A.; ASTUDILLO. V.; MAGALLANES N. **Fiebre Aftosa**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 458 p.

REVISÃO DA POLÍTICA E ESTRATÉGIAS DE COMBATE À FEBRE AFTOSA IMPLANTADAS PELO PROJETO DE CONTROLE DAS DOENÇAS DOS ANIMAIS. Elaboração: Grupo de Trabalho Criado pela Portaria N° 68, de 22 de julho de 1992, do Secretário Nacional de Defesa Agropecuária. Brasil, set., 1992.

ROSEMBERG, F. J. **Principios de epidemiologia**. Rio de Janeiro: CPFA. 1977 (serie de manuales didacticos, 1). 89 p.

ROSEMBERG, F. J.; GOIC, R. M. Programas de control y prevención de la fiebre aftosa en las Americas. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 12, p. 1-22, 1973.

SERRÃO, U. M. Programa Nacional de controle e erradicação da Febre Aftosa. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 6, p. 229-231, 1999.

SOUZA, J. G.; DÔLIVEIRA, C. F.D.; NOGUEIRA, J. M.; MACHADO, J. M.; FIGUEIREDO, V. C. F. **ACB do Programa Nacional de Prevenção e Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA)**. Brasília: MAPA, 2008. 48 p.

TORRES, J. G. R; INZAURRALDE, A. L. Erradicacion de la fiebre aftosa en las Américas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 6, p. 230-231, 1998.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. **Publications and documentation general information**. Disponível em: <<http://www.oie.int/publications-and-documentation/general-information>>. Acesso em: 13 maio 2015.

Capítulo 3

ANÁLISE DA MOVIMENTAÇÃO ANIMAL E CARACTERIZAÇÃO DE RISCO EM ESTUDOS PARA AVALIAÇÃO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA EM ÁREAS COM VACINAÇÃO: O CASO DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL, 2013

Resumo

O reconhecimento da condição sanitária de livre de febre aftosa (FA) tem importância estratégica para países com potencial para exportação pecuária. Este reconhecimento envolve, entre outras questões, a demonstração de ausência de infecção ou transmissão do vírus da FA, tarefa de maior complexidade em regiões onde a vacinação é utilizada de forma sistemática e massiva. Buscando amenizar as limitações existentes e aumentar a sensibilidade dos estudos em áreas com vacinação, os países têm adotado estratégias de vigilância baseada em risco. Este trabalho descreve a abordagem metodológica e operacional, fundamentada em fatores de risco, utilizada para reconhecimento de zona livre de FA com vacinação constituída por parte dos estados das Regiões Norte e Nordeste do Brasil. Por se tratar de região de grande extensão geográfica e de produção pecuária heterogênea, inicialmente, foram identificados circuitos de comercialização, com base na análise da movimentação de bovinos entre propriedades rurais, que levaram à constituição de cinco subpopulações amostrais. Em cada subpopulação amostral foi conduzido, de forma independente, estudo em duas etapas visando a detecção do agente viral. Buscando aumentar a probabilidade de detecção, foram utilizados fatores de risco baseados na espécie e grupo etário de maior suscetibilidade em regiões com vacinação e na disseminação do agente viral por meio da movimentação animal. Com base nos fatores de risco identificados, as ações de vigilância foram dirigidas a bovinos jovens localizados em propriedades rurais com maior probabilidade de ingresso de animais, distribuídas em municípios com maior intensidade de movimentação. As atividades de vigilância incluíram repetidas inspeções clínicas, aplicação de testes de detecção de anticorpos contra proteínas não-estruturais do vírus da FA (“DIVA tests” - *Differentiation of Infected from Vaccinated Animals*) e utilização de animais sentinelas. O trabalho foi conduzido entre 2012 e 2013, e os resultados apoiaram o reconhecimento da zona livre pela OIE, em maio de 2014.

Palavras-chave: FMD, vigilância baseada em risco, testes DIVA, fatores de risco, proteína não-estrutural

Introdução

A febre aftosa (FA) mantém-se endêmica em diferentes regiões do mundo, registrando, especialmente no final dos anos 90 e início do presente século, reintroduções em países ou zonas livres, com relevantes prejuízos econômicos e sociais, o que reforça sua reconhecida importância para o comércio mundial de animais e produtos de origem animal (MCLAWS e RIBBLE, 2007; HAMMOND et al., 2009; JAMAL E BELSHAM, 2013; KNIGHT-JONES e RUSHTON, 2013; BRITO et al., 2015; CLAVIJO et al., 2015). Segundo Brito et al. (2015), as atuais áreas endêmicas para FA podem ser agrupadas em sete *pools* geográficos compartilhando agentes virais semelhantes, que surgem como consequência, entre outros fatores, de particularidades locais relacionadas a condições ecológicas, sistemas de produção pecuária e tradições culturais. Na América do Sul, região envolvida no presente estudo, predomina o “*pool 7*”, com ocorrências esporádicas dos sorotipos O e A topotipo Euro-SA. Esta região chegou ao final de 2014 com 60% de seu território reconhecido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como livre de FA com vacinação e 24%, como livre de FA sem vacinação, envolvendo, aproximadamente, 94% da população de bovinos e bubalinos (PANAFTOSA, 2015). Na região, segue em execução o Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa, implantado em 1987. Em sua última revisão, ocorrida em 2010, foram reforçados os objetivos gerais de erradicação e de consolidação de mecanismos de prevenção, em toda a região, até 2020 (SARAIVA, 2009; PANAFTOSA, 2010; NARANJO E COSIVI, 2013).

Independente da condição regional da doença e da importância das ações conjuntas de intervenção, países com produção pecuária com potencial para exportação esforçam-se para sua erradicação e buscam o reconhecimento internacional de livre da doença. Entre as condições para o mencionado reconhecimento, as autoridades nacionais devem demonstrar ausência de infecção, no caso de país ou zona livre sem vacinação, ou de transmissão do agente viral, no caso de país ou zona livre com vacinação (OIE, 2017). Essa demonstração deve ser realizada de forma científica, apoiada em informações de qualidade comprovada. O Código Sanitário para os Animais Terrestres da OIE (Código Terrestre) apresenta orientações gerais sobre os procedimentos de vigilância a serem utilizados, que devem estar adaptados às condições específicas de cada país. Estas orientações estão complementadas no “*Guide to Terrestrial Animal Health Surveillance*” (OIE, 2014). Como se observa, não há modelo único para atendimento a essa demanda, que deve estar fundamentada, de preferência, em ações contínuas de vigilância, suportadas por adequado sistema de informação (MARTIN et al., 2007;

CAPORALE et al., 2012). Em populações submetidas a campanhas massivas e sistemáticas de vacinação contra a FA, as atividades para demonstração de ausência de transmissão viral sofrem maiores restrições. Há preocupações quanto à possibilidade de ocorrência sub clínica da doença e quanto às dificuldades e limitações para identificar fontes de infecção resultantes do contato de animais imunes com o agente viral, com possibilidade de se tornarem portadores do vírus da FA, apesar de persistirem questões não esclarecidas quanto ao verdadeiro risco que representam para transmissão da doença (ROSENBERG e MELLO, 1974; KITCHING, 2002a,b; SUTMOLLER e OLASCOAGA, 2002a; KITCHING et al., 2005; TENZIN et al., 2008; CLERCQ e PATON, 2009; GARLAND e CLERCQ, 2011; PATON et al., 2014; PARTHIBAN et al., 2015). Visando aumentar a sensibilidade dos estudos em populações vacinadas, nos últimos anos, os países têm concentrado as investigações em regiões e populações de estudo de maior probabilidade de ocorrência da doença, identificadas com base em fatores de risco devidamente comprovados (CAPORALE et al., 2012). Neste sentido, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) publicou detalhado manual sobre vigilância baseada em risco, visando apoiar a demonstração de áreas livres de doenças (FAO, 2014).

O Brasil está entre os países onde a certificação de livre de FA é condição fundamental para manutenção e ampliação de mercados para a produção pecuária nacional. Ao final de 2015, 24 estados, de um total de 27, estavam incluídos em zonas livres de FA, representando cerca de 77% do território brasileiro, onde se encontram, aproximadamente, 98% dos rebanhos bovino e bubalino. Todos os dossiês enviados à OIE, solicitando o reconhecimento de zonas livres de FA, estiveram acompanhados de estudos epidemiológicos para apoiar a demonstração de ausência de transmissão viral, parte deles sintetizada por Gonçalves et al. (2003). Cada estudo considerou e se adequou às particularidades geográficas e agroprodutivas das regiões avaliadas.

O presente artigo descreve a estratégia brasileira utilizada para avaliação de transmissão do vírus da FA na zona livre com vacinação reconhecida pela OIE, em maio de 2014, onde último foco da doença foi registrado em junho de 2004, com isolamento da cepa O (BRASIL, 2013). Apresenta-se como proposta metodológica a ser utilizada para avaliação de transmissão viral em espaços geográficos de grande dimensão e em rebanhos submetidos à vacinação sistemática contra a FA. Traz contribuições sobre o uso da análise de redes da movimentação animal e de fatores de risco no delineamento de estudos populacionais, a partir de informações geradas dentro do próprio sistema nacional de defesa sanitária animal, a exemplo do cadastro de propriedades rurais e do controle da movimentação animal.

Material e métodos

Área geográfica envolvida

A área de estudo envolveu parte da Região Nordeste, constituída pelos Estados de Alagoas (AL), Ceará (CE), Maranhão (MA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio Grande do Norte (RN), e parte da Região Norte, representada por área do Estado do Pará (PA), conforme Figura 1. Possui uma extensão geográfica de, aproximadamente, 1,5 milhão de km², cerca de 17,5% do território nacional, contando, ao final de 2012 (ano anterior ao estudo), com um rebanho bovino e bubalino de 22,7 milhões de cabeças distribuídas em 685.280 propriedades rurais. Os bubalinos, em específico, representavam apenas 2,4% do rebanho total, dos quais 80% localizados no Estado do Pará. Registrava-se a existência de, aproximadamente, 13 milhões de pequenos ruminantes, com 75% localizados em três Estados (CE, PE e PI), e 4,5 milhões de suínos criados em pequenas explorações familiares com objetivo principal de consumo interno e comércio local.

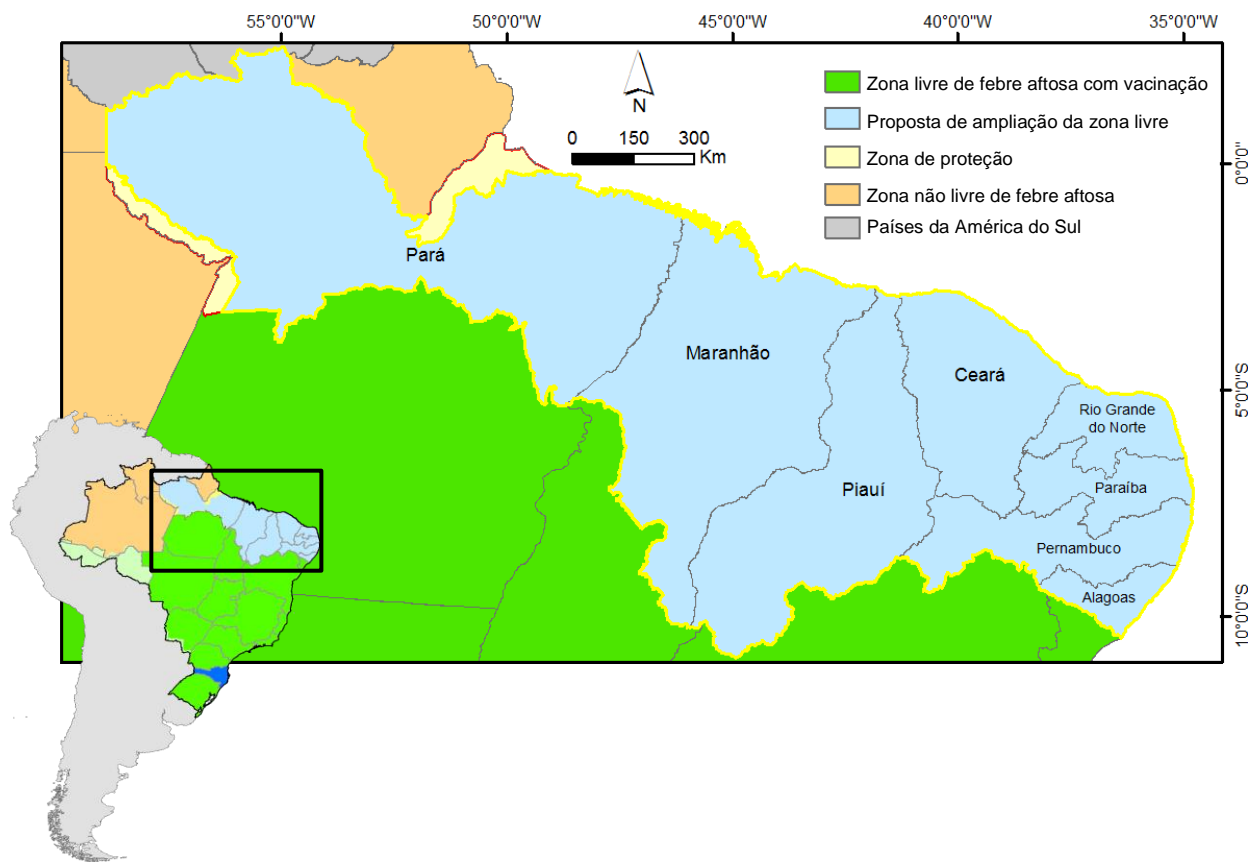


Figura 01. Área geográfica envolvida no estudo de avaliação de transmissão do vírus da FA, Brasil, 2014

Em todos os Estados estão disponíveis estruturas próprias do serviço veterinário oficial, que executam as atividades de vigilância e fiscalização preconizadas no Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), sob acompanhamento e supervisão do Governo Federal (DSA, 2007). A vacinação contra a FA é obrigatória para bovinos e bubalinos, realizada a cada seis meses, utilizando-se vacina trivalente, com adjuvante oleoso, formulada com as cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial. Toda vacina é produzida por laboratórios privados, com nível de biossegurança P3+, sob fiscalização do serviço veterinário oficial e seguindo recomendações da OIE, incluindo testes para avaliação de pureza quanto à indução de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA, incorporados no sistema oficial de controle a partir de 2008 (BRASIL, 2008a).

Estratégia e metodologia utilizadas

O delineamento do estudo envolveu duas fases, cujos procedimentos adotados estão detalhados nos itens seguintes deste documento. A primeira fase buscou responder à questão inicial: como considerar e conduzir a investigação na população-alvo, representada pelo rebanho pecuário de animais susceptíveis existentes na região? Tendo em vista que a região representa um espaço geográfico complexo e de grande extensão, na hipótese de haver transmissão viral, não se espera uma distribuição homogênea (ou uniforme) de animais infectados. Assim, considerar toda a região como uma única população, caracterizaria um estudo de baixa sensibilidade e de baixa representatividade populacional. Por outro lado, considerar cada um dos oito estados envolvidos como populações independentes para avaliação de transmissão viral, seria desconsiderar as características epidemiológicas da doença, podendo levar a esforço amostral e custos desnecessários.

Após a primeira fase, ou seja, configuração do espaço de investigação (ou amostral), surge a seguinte questão básica: caso esteja ocorrendo transmissão viral, onde e como identificá-la? A segunda fase do delineamento tem como objetivo responder esta questão. Para isso, foi implantada estratégia de vigilância baseada em risco (FAO, 2014; OIE, 2014) e estudo de detecção em duas etapas, com implantação de atividades longitudinais de avaliação clínica e de coleta de amostras de soro sanguíneo para detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA, por meio dos denominados “DIVA tests” - *Differentiation of Infected from Vaccinated Animals* (CAMERON E BALDOCK, 1998; KITCHIN, 2002a,b; ZILLER et al., 2002; PATON, et al., 2014).

Configuração do espaço de investigação (primeira fase do delineamento)

Considerando que a forma mais comum de dispersão do vírus da FA é por meio do contato entre animais infectados e susceptíveis (OLASCOAGA et al., 1999; KITCHING et al., 2005), partiu-se do princípio de que, na presença de transmissão viral, haveria maior probabilidade de detectar animais infectados em rebanhos localizados em um mesmo circuito de comercialização. Dessa forma, a movimentação de bovinos e bubalinos, espécies de maior importância epidemiológica para ocorrência e manutenção das cepas virais prevalentes na América do Sul (DORA et al., 1984; OLASCOAGA et al., 1999), foi avaliada com objetivo de identificar espaços amostrais específicos, representados por circuitos de comercialização, com maior grau de independência para o intercâmbio de animais entre propriedades rurais, sem desconsiderar características demográficas e de organização do sistema produtivo. A análise da movimentação animal em apoio às atividades de intervenção sanitária tem sido utilizada na América do Sul desde final da década de 70, por meio da caracterização dos espaços agroprodutivos e dos ecossistemas de FA (OBIAGA et al., 1979; MATHIAS et al., 1981; ASTUDILLO, 1984; ASTUDILLO et al., 1986; MORAES, 1993; OLASCOAGA et al., 1999; MELO e LÓPEZ, 2002). A relevância da movimentação animal para dispersão do vírus da FA está, mais uma vez, claramente demonstrada nas epidemias registradas no Reino Unido e na América do Sul, no começo dos anos 2000, sendo o seu controle medida indispensável para contenção dos focos da doença (SUTMOLLER e OLASCOAGA, 2002b; PEREZ et al., 2004a,b; WARD e PEREZ, 2004; FEVRE et al., 2006; MCLAWS e RIBBLE, 2007; NEGREIROS et al., 2009).

Assim, para definir uma estratificação da área de estudo que considere o trânsito de animais, juntamente com as características demográficas e as características regionais do sistema produtivo, foi realizado um procedimento em quatro etapas: i) compilação de movimentos em unidades políticas com características demográficas e socioeconômicas similares, ii) detecção de circuitos pecuários através da análise de trânsito animal entre essas unidades, iii) validação da divisão por grupos de especialistas e iv) avaliação da qualidade da divisão final através do grau de independência entre os estratos amostrais.

Os municípios constituem as unidades autônomas de menor hierarquia dentro da organização político-administrativa do Brasil e as microrregiões geográficas representam um conjunto de municípios, contíguos e contidos em um mesmo Estado, definidas com base em características do quadro natural, da organização da produção e de sua integração socioeconômica (LEMOS, 2003; IBGE, 2011). Assim, a primeira etapa consistiu em aglomerar o trânsito animal de municípios pertencentes à mesma microrregião geográfica, de maneira a considerar características socioeconômicas da região.

Na segunda etapa, foi realizada a detecção de circuitos pecuários através da metodologia apresentada por Grisi-Filho et al. (2013). Essa metodologia permite, através da análise do trânsito animal entre propriedades rurais, e utilizando teorias da área de redes complexas, descobrir quais são os grupos de localidades nos quais um animal mais provavelmente irá permanecer do seu nascimento até o envio ao abate, envolvendo o ciclo produtivo entre propriedades rurais. Assim, o resultado desta etapa é a divisão da área em conjuntos de microrregiões nas quais um animal tem maior probabilidade de permanecer ao longo de sua vida até o envio ao abate, constituindo, portanto, um circuito de comercialização pecuária entre propriedades rurais. As divisões encontradas foram unidas seguindo os critérios de intensidade de trânsito e proximidade geográfica.

Para a validação da divisão proposta junto a especialistas (terceira etapa), aos grupos de localidades identificados na etapa anterior, foram sobrepostos fluxos dominantes da movimentação de bovinos e bubalinos entre municípios, obtidos por meio do *plugin Flow* do *software* livre TerraView, versão 4.2.2 (TERRA VIEW, 2010). Os resultados foram apresentados a profissionais dos serviços veterinários de cada estado envolvido, com conhecimento local do sistema produtivo. Os profissionais poderiam, nessa etapa, sugerir modificações à divisão proposta, de maneira a garantir que a estratificação espacial final estivesse harmonizada com o conhecimento local do sistema produtivo.

A última etapa envolveu a avaliação da qualidade da estratificação através do grau de independência, definido como percentual de bovinos e bubalinos movimentados entre propriedades rurais situadas em cada estrato. Ou seja, o número de animais movimentados que tiveram como origem e destino a mesma subpopulação amostral. Quanto maior este valor, maior a independência quanto à comercialização animal entre propriedades rurais de uma determinada região em relação às demais.

Banco de dados de movimentação animal

No Brasil, a movimentação de animais de interesse pecuário somente é autorizada por meio da emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA), que contém informações como origem, destino, finalidade da movimentação e quantidade de animais movimentados, por faixa etária (BRASIL, 2006). Para o estudo, foram utilizados bancos de dados de GTAs dos serviços veterinários oficiais, referentes aos anos de 2011 e 2012. Optou-se por trabalhar com uma série histórica de dois anos de forma a representar, pelo menos, um ciclo produtivo para comercialização de bovinos e bubalinos entre propriedades rurais, e, dessa forma, estimar e prever uma tendência geográfica de comercialização animal. A finalidade de abate não foi considerada no estudo, uma vez que não representa risco significativo para transmissão ou manutenção da doença entre rebanhos. O banco de dados envolveu 779.647 GTAs, referentes à autorização para movimentação de 7.049.635 animais.

Estratégia para avaliação de transmissão viral (segunda fase do delineamento)

a) Fatores de risco considerados

O processo de identificação e utilização dos fatores de risco envolveu a seguinte sequência de definições: primeiro, eleição da espécie e grupo etário de maior susceptibilidade ao vírus da FA; segundo, identificação das propriedades rurais onde se localizam os referidos animais de eleição (espécie e grupo etário); e, por fim, localização destas propriedades rurais.

Quanto às espécies, os bovinos e bubalinos são os animais de eleição, considerando a maior susceptibilidade às cepas virais prevalentes na região e o papel epidemiológico que representam tanto para manutenção como para difusão do agente viral (OLASCOAGA et al., 1999). Tratando-se de populações submetidas à vacinação massiva e sistemática, considerou-se como categoria etária de maior suscetibilidade os animais jovens não vacinados ou com reduzido histórico de vacinação. Dessa forma, a população de estudo foi constituída por bovinos e bubalinos entre 6 e 24 meses de idade (unidades elementares de amostragem), buscando-se reduzir, de um lado, a possível interferência de imunidade materna e, de outro, a interferência de possíveis anticorpos contra PNEs presentes em animais multivacinados. O referido grupo etário também inclui a categoria animal de maior risco epidemiológico devido à condição de movimentação entre propriedades rurais, por razões de comércio (CAETANO JÚNIOR, 2000), e atende à certificação solicitada pela OIE de ausência da doença nos últimos 24 meses e de indícios de transmissão viral nos últimos 12 meses, em zonas livres com vacinação (OIE, 2017). Destaca-se que, no país, somente bovinos e bubalinos são incluídos nas campanhas sistemáticas de vacinação contra a FA.

Nos estados onde há maior concentração de pequenos ruminantes, os ovinos e caprinos, com mais de três meses de idade, foram incluídos como unidades elementares de amostragem quando em convivência com bovinos ou bubalinos. Os suínos, devido à baixa concentração na região e por não desenvolverem papel de portadores do agente viral (OLASCOAGA et al., 1999; GARLAND e CLERCQ, 2011), não foram considerados na amostragem.

Quanto às propriedades rurais, buscou-se identificar os rebanhos com maior concentração de bovinos jovens, utilizando-se os seguintes critérios de seleção: razão entre bovinos ou bubalinos até 12 meses e fêmeas acima de 36 meses, $\geq 70\%$; ou participação de bovinos ou bubalinos até 24 meses em relação ao total no rebanho, $\geq 25\%$. Na realidade nacional, estes indicadores apontam para propriedades rurais com maior ingresso e comercialização de bovinos jovens (≤ 24 meses), implicando, portanto, em maior risco de introdução do agente viral. Para análise dos indicadores e seleção das propriedades rurais foram utilizados os bancos de dados de cadastro de propriedades rurais sob controle dos serviços

veterinários oficiais em cada estado envolvido no estudo, que contêm dados sobre os rebanhos bovinos e bubalinos, por faixa etária, mantidos atualizados principalmente durante a emissão de GTAs para movimentação animal (ingresso e egresso) e durante as etapas de vacinação contra a FA, que na maioria dos estados ocorre de seis em seis meses.

Com relação à localização das propriedades rurais, o último fator de risco utilizado foi baseado na movimentação animal, com objetivo de identificar os municípios com maior intensidade de ingresso ou egresso de bovinos ou bubalinos, considerando a mesma base de GTAs de 2011 e 2012. O total selecionado de municípios considerou, além da intensidade de movimentação de bovinos e bubalinos, a distribuição geográfica, buscando-se uma adequada representatividade do espaço amostral.

Em síntese, a estratégia do estudo, visando aumentar a eficiência de detecção de transmissão do vírus da FA, envolveu a investigação de bovinos jovens (6 a 24 meses de idade) localizados em propriedades rurais com maior participação destes animais, distribuídas em municípios com maior intensidade de movimentação de bovinos e bubalinos.

b) Eleição e alocação das unidades primárias de amostragem (UPAs)

A fundamentação epidemiológica do estudo considerou as seguintes hipóteses estatísticas e epidemiológicas, independentes para cada subpopulação amostral: i) caso exista transmissão viral em pelo menos 1% das propriedades rurais com animais susceptíveis com até 24 meses de idade, espera-se, com 95% de confiança, detectar pelo menos uma propriedade positiva; e ii) se em cada propriedade com transmissão viral existirem, pelo menos, 10% (em propriedades com até 500 animais) ou 5% (em propriedades com 500 ou mais animais) de bovinos ou bubalinos jovens infectados, a probabilidade de encontrar pelo menos um animal positivo em cada uma delas é de 95%.

A seleção dos animais para inspeção e amostragem foi realizada em duas etapas (CAMERON e BALDOCK, 1998; FAO, 2014; OIE, 2014): primeiro com a seleção de propriedades rurais, entendidas como unidades primárias de amostragem (UPAs), e, a segunda, com a seleção, em cada UPA, das unidades elementares de amostragem (bovinos e bubalinos entre 6 e 24 meses de idade e, quando disponíveis, pequenos ruminantes com mais de três meses de idade).

Cada UPA representou um *cluster* definido como rebanho, ou agrupamento de rebanhos com proximidade física, constituído por animais com probabilidade semelhante de terem contato com o vírus da FA caso exista algum animal infectado dentro do grupo (ZILLER et al., 2002). De forma a evitar as limitações para avaliação de transmissão viral em pequenos rebanhos, destacadas por Paton et al. (2004), e garantir uma sensibilidade de rebanho em cada UPA de, pelo menos, 95%, conforme discutido por Greiner e Dekker (2005), foi estabelecido

um número mínimo de unidades elementares por UPA, considerando o tamanho médio dos rebanhos em cada subpopulação e questões operacionais relacionadas ao número de propriedades rurais para vigilância. Assim, nos Estados do Maranhão e do Pará, que apresentaram média e mediana de 30 e 12 bovinos até 24 meses por propriedade, respectivamente, cada UPA foi programada para ter, pelo menos, 20 unidades elementares de amostragem. Nos demais Estados, onde a média e mediana foram, respectivamente, de 10 e 5 bovinos até 24 meses, o valor mínimo foi de 10 de unidades elementares de amostragem. Dessa forma, nas situações em que uma propriedade selecionada não continha o número mínimo especificado de animais elegíveis, propriedades vizinhas ou próximas foram agrupadas em uma só UPA, até atender o total mínimo de unidades elementares de amostragem. As propriedades selecionadas que não continham bovinos ou bubalinos entre 6 e 24 meses de idade no momento da inspeção pelo serviço veterinário oficial foram substituídas por outras localizadas no mesmo município e nas proximidades da propriedade selecionada.

O total de UPAs em cada subpopulação foi definido utilizando-se o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, disponibilizado pelo *Animal Health Services – AusVet* (MARTIN et al., 1992; EPITOOLS, 2012; SERGEANT, 2015). Conforme a hipótese estatística apresentada, os parâmetros para cálculo do número de UPAs, em cada subpopulação amostral, considerou: prevalência mínima esperada de rebanhos infectados de 1% e sensibilidade e nível de confiança de 95%. A especificidade utilizada foi de 100%, considerando que cada UPA com pelo menos um animal com sinais clínicos compatíveis com doença vesicular ou resultado soropositivo foi submetida a investigações complementares de forma a descartar ou confirmar a presença de infecção (ZILLER et al., 2002; GREINER e DEKKER, 2005; FAO, 2014). Para cada subpopulação foi definido o total de 350 UPAs, número já acrescido em 10% para compensar possíveis perdas no processo de constituição da amostra.

A alocação das UPAs ocorreu de forma proporcional ao total existente de animais no município em relação ao total da subpopulação envolvida, garantindo-se pelo menos uma UPA em cada município de alta movimentação. Os municípios considerados como de alta movimentação para este trabalho, representaram 67% do total de municípios da região. Especificamente em Pernambuco, foram incluídas mais seis UPAs com pequenos ruminantes, de forma a cobrir a região sul do Estado, onde predomina a produção de caprinos e ovinos.

Nos municípios escolhidos, as propriedades rurais foram selecionadas, de forma aleatória, a partir da relação de propriedades definidas com base nos critérios apresentados anteriormente. A partir da lista de propriedades selecionadas, os serviços veterinários oficiais realizaram as visitas de campo para constituir as UPAs e dar início às atividades de vigilância dirigidas à detecção de transmissão viral.

c) Prevalência intra rebanho

Para definição do número de animais para amostragem e investigação em cada UPA também foi utilizado o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators* (MARTIN et al., 1992; EPITOOLS, 2012; SERGEANT, 2015). Trabalhou-se com nível de confiança de 95%, considerando prevalência mínima esperada, intra rebanho, de 10% em UPAs com até 500 animais e de 5% em UPAs com mais de 500 animais, no caso de bovinos e bubalinos de 6 a 24 meses, e distribuição hipergeométrica. Para pequenos ruminantes, a prevalência mínima esperada foi de 10%. Os valores de prevalência intra rebanho considerados para rebanhos de bovinos e bubalinos mostram-se adequados à realidade das últimas reintroduções da FA no Brasil. Na primeira reintrodução, ocorrida em agosto de 2000, no Rio Grande do Sul, no foco índice foi registrada uma prevalência de 32% de bovinos com sinais clínicos (8/25). A doença concentrou-se especialmente no Município de Jóia, onde foram identificados mais 18 focos, envolvendo principalmente pequenos rebanhos (8 a 149 bovinos), com prevalência média de 19% de bovinos doentes. Nesta ocorrência, foram identificados mais três focos em três municípios limítrofes, envolvendo uma propriedade com oito bovinos, dos quais quatro (50%) com sinais clínicos da doença; uma propriedade com 55 bovinos, com nove (16%) doentes; e uma propriedade com 494 bovinos, onde a doença ficou concentrada em um lote de 52 bezerros dos quais 12 (23%) doentes (BRASIL, 2002). Uma segunda reintrodução ocorreu no mesmo Estado, em 2001, com registro de 30 focos localizados em seis diferentes municípios. Dos focos registrados, 21 eram propriedades com menos de 500 bovinos, com média de 17% de animais doentes, e nove com mais de 500 bovinos, com média de 4% de bovinos com sinais clínicos (BRASIL, 2002). Por fim, na última reintrodução registrada no país, no Estado do Mato Grosso do Sul, em outubro de 2005, no foco índice foi constatada uma prevalência de 26% de bovinos doentes (154/592). Posteriormente, foram identificados mais 33 focos, em rebanhos com tamanho médio de 475 bovinos e prevalência média de 10% de bovinos doentes (BRASIL, 2008).

Em complemento às informações sobre incidência de casos clínicos nas últimas ocorrências da FA em zonas livres com vacinação no Brasil, destacam-se informações obtidas em investigação sorológica realizada pelo serviço veterinário oficial durante as atividades de saneamento dos focos de FA registrados em 2005 (BRASIL, 2008b), identificando prevalência média de animais soropositivos de 16,2% (IC 95%: 12,4% a 19,9%) em propriedades com menos de 500 bovinos, e de 10,3% (IC 95%: 5,5% a 15,1%) em propriedades com 500 ou mais bovinos.

d) Testes laboratoriais utilizados

Para bovinos, como teste de triagem, foi utilizado o ELISA 3ABC, empregando-se Kit fornecido pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa – PANAFTOSA, nas subpopulações 1 e 2, e o Kit PrioCHECK[®], antigo Ceditest[®], nas subpopulações 3, 4 e 5. Como teste confirmatório, foi utilizada a prova Western Blot de Imunoelectrotransferência – EITB, com kit fornecido pelo PANAFTOSA. Para pequenos ruminantes foi utilizado apenas o Kit ELISA 3ABC PrioCHECK[®], uma vez que o sistema ELISA 3ABC/EITB do PANAFTOSA não estava validado para estas espécies (CLAVIJO et al., 2004; BROCCHI et al., 2006; PATON et al., 2006, PANAFTOSA, 2012a,b).

Para bovinos, os valores de sensibilidade e especificidade dos Kits ELISA utilizados, com base no trabalho de Goris et al. (2007), com soros de campo oriundos de Israel e modelo Bayesiano de análise, foram, respectivamente, 95,9% (IC95%: 90,6 – 99,9) e 95,5% (IC95%: 92,4 – 98,2) para o Kit PANAFTOSA; e 92,5% (IC95%: 86,3 – 97,4) e 97,8% (IC95%: 95,9 – 99,2) para o kit PrioCHECK[®]. Para pequenos ruminantes, os valores de sensibilidade e especificidade foram obtidos de Brocchi et al. (2006), que informaram, para o PrioCHECK[®], sensibilidade de 85%, com base em amostras obtidas nos focos de Israel, em 2004 (63 amostras), e do Reino Unido, em 2001 (100 amostras); e especificidade de 100% (IC95%: 99,2 – 100%) com base em 431 amostras de ovelhas não infectadas.

Para a prova EITB, segundo PANAFTOSA (2012a), a especificidade é de 99% e a sensibilidade próxima a 100%, para animais abaixo de 24 meses em rebanhos vacinados.

Os valores médios de sensibilidade, considerando o uso dos testes em série no caso de bovinos e apenas um teste no caso dos pequenos ruminantes, foram utilizados na definição do tamanho da amostra em cada UPA. Os animais que participaram da amostragem foram selecionados de forma aleatória, recebendo identificação individual de longa duração e mantidos sem vacinação contra a FA durante todo o estudo.

e) Estratégia para avaliação de transmissão viral

A estratégia básica para investigação de transmissão do vírus da FA em cada UPA envolveu o seguimento dos rebanhos selecionados, com realização de exames clínicos de boca e patas e coletas de amostras de soro sanguíneo para testes laboratoriais visando a detecção de anticorpos contra PNEs. As propriedades envolvidas passaram a ser monitoradas pelo serviço veterinário oficial, com inspeções realizadas em intervalos médios de 15 dias. Todas as atividades foram registradas por meio de formulários específicos, contemplando informações

sobre a localização geográfica da propriedade rural, rebanhos susceptíveis existentes e resultados dos exames clínicos realizados, entre outros dados. Todas as informações foram inseridas em sistema informatizado disponibilizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As amostras foram enviadas para processamento por um dos laboratórios oficiais do MAPA, acompanhadas das seguintes informações referentes a cada animal amostrado: identificação; idade, em meses; sexo; número de vacinações aplicadas no animal durante sua permanência na propriedade; origem do animal, se nascido ou não na propriedade rural; e resultado dos exames clínicos de boca e patas.

Nas UPAs onde todos os testes laboratoriais foram negativos e não foram encontrados sinais clínicos compatíveis com doença vesicular, as propriedades rurais foram liberadas, após inspeção final pelo serviço veterinário oficial (cada propriedade foi submetida a, pelo menos, três inspeções: uma inspeção inicial, uma inspeção para coleta de amostras e uma inspeção final para liberação da propriedade). Em todas as inspeções foram realizados exames clínicos de boca e patas, tanto nos animais amostrados como em outros animais susceptíveis existentes nas propriedades rurais.

As UPAs com pelo menos um resultado soropositivo ou indeterminado foram classificadas como possivelmente infectadas, dando origem à investigação epidemiológica complementar. As propriedades integrantes dessas UPAs permaneceram no estudo para realização de coleta pareada e novos exames clínicos. A coleta pareada constitui uma das estratégias previstas no Código Terrestre para seguimento dos resultados soropositivos, representando a coleta de amostras de soro sanguíneo nos mesmos animais amostrados na coleta imediatamente anterior (OIE, 2017). Para isso, como mencionado, os animais receberam identificação individual de longa duração e permaneceram sem vacinação contra a FA durante todo o estudo.

Com base nos resultados da coleta pareada e dos exames clínicos complementares, as propriedades pertencentes a UPAs sem permanência de animais soropositivos ou indeterminados e sem evidências clínicas de doença vesicular foram liberadas após inspeção final pelo serviço veterinário oficial e liberadas para vacinação contra a FA. Nas UPAs com permanência de pelo menos um animal soropositivo ou indeterminado após a segunda coleta, as atividades de investigação complementar foram mantidas, incluindo novos exames clínicos; avaliação epidemiológica; e introdução de animais sentinelas. A utilização de animais sentinelas também se fundamentou nas estratégias previstas no Código Terrestre (OIE, 2017,

2014). Esses animais foram obtidos em propriedades rurais localizadas nos estados envolvidos no estudo e selecionadas pelos serviços veterinários oficiais. Os animais sentinelas foram representados por bovinos de 6 a 12 meses de idade, não vacinados contra a FA e negativos aos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra proteínas estruturais (teste ELISA CFL – competição em fase líquida) e não-estruturais (teste ELISA 3ABC) do vírus da FA, recebendo identificação individual de longa duração. Em cada UPA onde permaneceram animais soropositivos foram introduzidos um ou dois animais sentinelas que foram mantidos por, pelo menos, 30 dias em convivência com os animais amostrados. Os animais sentinelas foram submetidos a duas coletas de amostras de soro sanguíneo, uma no dia de ingresso nas UPAs e outra após 15 dias de convivência com os animais amostrados, momento em que esses animais também foram submetidos a uma segunda coleta pareada. A convivência dos animais sentinelas com os amostrados foi mantida até o resultado final dos testes laboratoriais e a realização de último exame clínico pelo serviço veterinário oficial.

A análise da distribuição espacial, incluindo a identificação de *clusters*, esperados em processos infecciosos envolvendo doenças transmissíveis como a FA, foi realizada com base nas coordenadas geográficas de cada propriedade envolvida no estudo, utilizando-se sistema de coordenadas planas com *datum* SIRGAS2000. Para as UPAs constituídas por mais de uma propriedade, as análises espaciais consideraram o ponto central calculado a partir das coordenadas geográficas das propriedades de cada UPA. Por meio de matriz de proximidade, foi avaliada a distância entre as UPAs, identificando-se, para cada uma, a distância entre o vizinho mais próximo, de forma a verificar a viabilidade epidemiológica para constituição de *clusters*. Para análise de *clusters* foi utilizado o software SaTScan™, empregando-se o método de varredura espacial, com nível de significância de 5%, configurando o aplicativo para o modelo de distribuição de Poisson para dados discretos, opção *High* (KULLDORFF, 2007, 2009).

Todo o trabalho foi executado pelo serviço veterinário oficial. O MAPA foi responsável pelo delineamento e pela coordenação geral do estudo, seleção das propriedades rurais para constituição das UPAs, realização e análise dos testes laboratoriais, manutenção do sistema informatizado para gerenciamento de todo banco de dados, elaboração de manuais técnicos e treinamento das equipes de campo. Os serviços veterinários dos estados ficaram responsáveis pelas atividades de campo, constituindo equipes locais específicas, sob responsabilidade de médicos veterinários do serviço oficial, que participaram de treinamento ministrado pela equipe central de coordenação.

Resultados

Configuração do espaço amostral

Os oito Estados envolvidos no estudo foram agrupados em cinco circuitos de comercialização (Figura 2), considerados como cinco subpopulações amostrais, nas quais foram conduzidos estudos epidemiológicos independentes. A Subpopulação 1 ficou constituída pelo PA, com grau de independência de 96% e a Subpopulação 2, pelo MA, com grau de independência de 98%. A região norte do PI e maior parte do CE constituíram a Subpopulação 3, com 93% de independência; e a região sul do CE e PI, mais AL e PE, representaram a Subpopulação 4, com 92% de independência. Por fim, PB e RN, incorporados em uma segunda fase do estudo, constituíram a Subpopulação 5, com 89% de independência.

Nas subpopulações 1, 2, 3 e 4, os trabalhos de campo, representados pelas inspeções às propriedades selecionadas para constituição das UPAs, foram iniciados nos meses de abril e maio de 2012. Nestas subpopulações, as primeiras coletas de amostras concentraram-se nos meses de junho e julho e as atividades de vigilância e investigação complementar foram finalizadas em março de 2013. Na subpopulação 5, as inspeções às propriedades para formação das UPAs foram iniciadas em outubro de 2012, com realização das primeiras coletas de amostras concentrando-se nos meses de novembro e dezembro de 2012, e as atividades de vigilância e investigação complementar conduzidas até maio de 2013.

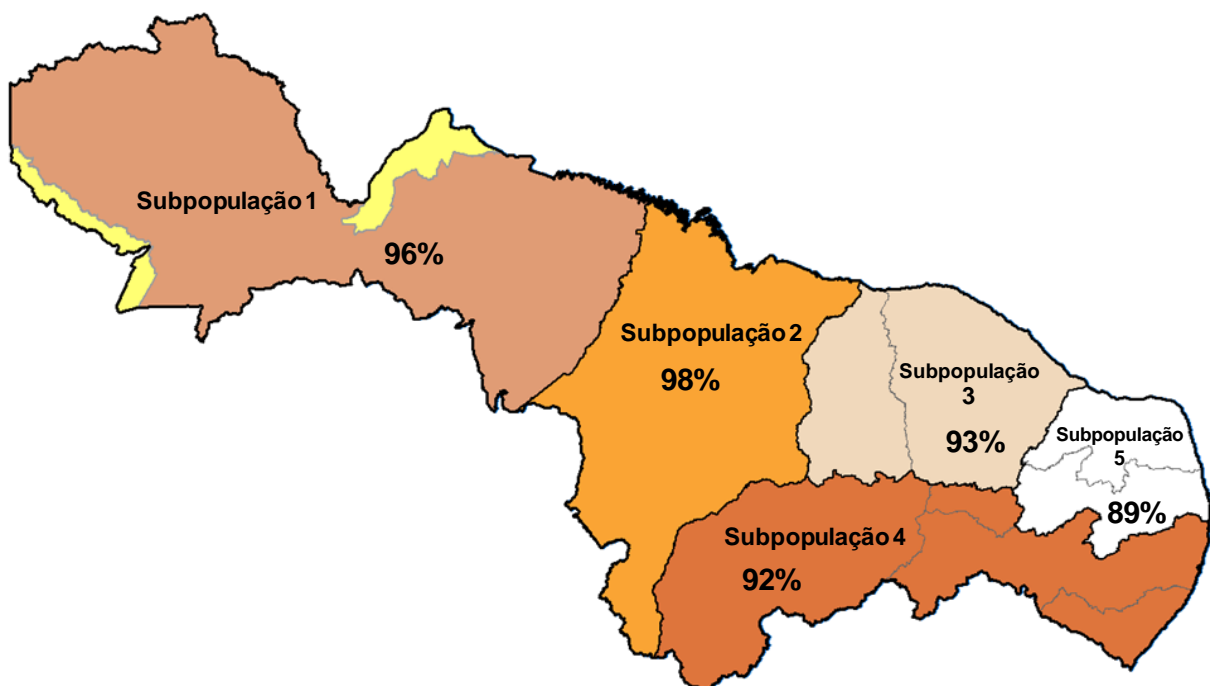


Figura 02. Agrupamento da região de estudo em subpopulações amostrais, com destaque do grau de independência.

Descrição da amostra obtida

Nas Tabelas 1 a 3 são apresentadas informações sobre as subpopulações amostrais, incluindo o total existente de animais, total de UPAs e propriedades rurais selecionadas, e animais amostrados em cada subpopulação amostral. A distribuição geográfica das propriedades rurais selecionadas para constituição das UPAs pode ser avaliada por meio da Figura 3. Considerando apenas as 1.750 UPAs com exploração de bovinos e bubalinos, estas ficaram constituídas por 1.936 propriedades rurais, das quais 64% dedicadas à bovinocultura de corte, 20% à produção mista (corte e leite) e 16% à produção leiteira.

Em relação à origem dos animais, de forma geral, 73% dos bovinos amostrados e 95% dos pequenos ruminantes eram nascidos nas propriedades selecionadas. De acordo com relato dos responsáveis pelos animais, entre os animais nascidos nas propriedades 11% (3.865 bovinos) tratavam-se de bovinos não vacinados, 47% apresentavam histórico de apenas uma vacinação; 31%, duas vacinações; e 11%, três a quatro vacinações. Considerando todos os bovinos e bubalinos amostrados, a participação de animais sem vacinação ou com apenas uma vacinação declarada, variou de 59% na Subpopulação 3 a 67% na Subpopulação 2.

Tabela 01. Informações sobre o total de UPAs constituídas e propriedades rurais selecionadas em cada subpopulação amostral, incluindo total existente de animais susceptíveis, população estudada e animais amostrados nas UPAs.

Subpopulação	Informações sobre a área avaliada ¹			Informações referentes à amostra					
	Prop. existente ²	Bov. existente ³	PR existente ⁴	UPA ⁵	Prop ²	População existente		População estudada	
						Bov ³	PR ⁴	Bov 6-24 m	PR > 3 m
1	40.826	4.777.656	510.134	350	382	241.029	3.154	90.769	1.534
2	100.675	7.293.656	268.293	350	394	268.224	6.893	119.724	4.990
3	53.483	2.822.105	4.142.136	350	395	65.486	33.357	19.073	22.262
4	186.573	5.170.819	5.881.987	356	400	94.694	18.196	42.645	10.813
5	100.590	2.318.974	2.021.985	350	371	110.204	25.743	30.606	15.928
Total	482.147	22.383.210	12.824.535	1.756	1.942	779.637	87.343	302.817	55.527

1. Informações referentes ao início de 2012, momento em que foi realizado o delineamento do estudo

2. Prop: propriedades rurais com bovinos, bubalinos ou pequenos ruminantes; 3. Bov: bovinos ou bubalinos; 4. PR: pequenos ruminantes (ovinos ou caprinos); 5. UPA: unidade primária de amostragem

Tabela 02. Informações sobre o total de UPAs e animais selecionados por subpopulação amostral.

Subpopulação	Total de UPAs	Total de Propriedades	Tamanho médio do rebanho bovino e bubalino nas UPAs		Bovinos amostrados*				Pequenos ruminantes amostrados
			Até 24 meses	Total	Total	Média	Mínimo	Máximo	
1	350	382	150	631	11.838	34	20	68	0
2	350	394	166	681	10.828	31	20	65	0
3	350	395	45	166	8.152	23	10	66	4.280
4	356	399	70	237	9.321	27	10	70	2.550
5	350	371	78	297	8.701	25	16	60	3.058
Total	1.756	1.941	102	401	48.840	28	10	70	9.888

* Referentes à primeira coleta

Tabela 03. Informações sobre as unidades elementares de amostragem, registradas durante a primeira coleta de amostras.

Subpopulação	Origem dos animais (se nascidos nas propriedades)				Idade (em meses) dos animais amostrados								
	Bovinos e bubalinos		PR*		Bovinos e bubalinos				PR*				
	Sim	Não	Sim	Não	< 6	6 a 12	13 a 18	19 a 24	> 24	3 a 6	7 a 12	13 a 24	> 24
1	8.258	3.580	0	0	0	5.579	4.781	1.478	0	0	0	0	0
2	5.607	5.221	0	0	3	4.547	4.761	1.517	0	0	0	0	0
3	7.536	718	4.485	124	0	3.997	2.631	1.626	0	678	1.388	1.438	1.105
4	6.174	3.155	2.360	190	6	3.763	4.059	1.501	0	363	803	843	541
5	8.118	583	2.881	177	2	4.723	2.733	1.214	29	560	882	1.033	583
Total	35.693	13.257	9.726	Não	11	22.609	18.965	7.336	29	1.601	3.073	3.314	2.229

* PR: pequenos ruminantes (ovinos ou caprinos)

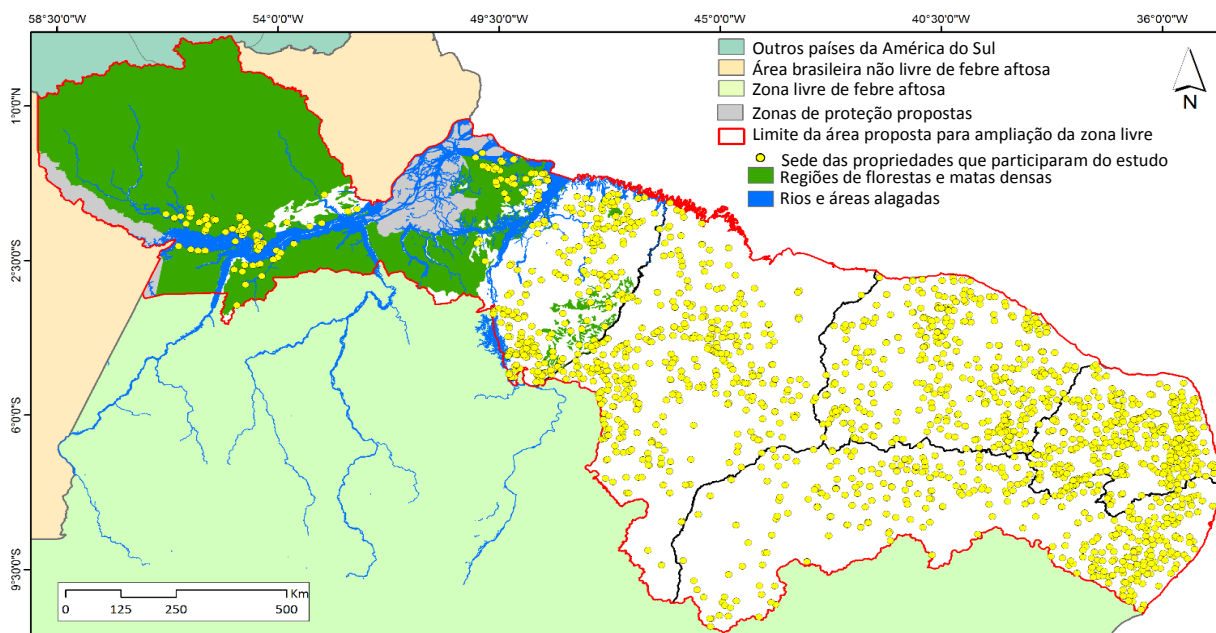


Figura 03. Localização geográfica das sedes das propriedades rurais que participaram do estudo

Atividades de vigilância clínica

Todas as propriedades selecionadas foram submetidas a inspeções pelo serviço veterinário, com maior frequência nas UPAs com resultados indeterminados ou soropositivos aos testes laboratoriais utilizados. Em todo o estudo foram realizadas 11.498 inspeções nas propriedades rurais selecionadas, sendo que 21% receberam de 3 a 4 inspeções; 60% de 5 a 7 inspeções; e 18%, oito ou mais inspeções. As medianas para os intervalos entre inspeções foram de 15 dias nas subpopulações 2 e 5; 16 dias na subpopulação 4; 17 dias na Subpopulação 1; e 20 dias na Subpopulação 3.

Durante as atividades de vigilância foram registradas 289.157 inspeções clínicas de boca e patas em bovinos e bubalinos e 58.793 em pequenos ruminantes, identificando-se 1.868 bovinos e 84 pequenos ruminantes com sinais clínicos caracterizados como traumatismo ou lesões secundárias decorrentes de processos infecciosos não compatíveis com doença vesicular. Também foi registrado o nascimento de 32.982 animais susceptíveis, dos quais, 71% representados por bovinos ou bubalinos, 24%, por pequenos ruminantes e 5% por suínos. Quanto a mortes, foi registrado um total de 3.849 casos, considerando todo o rebanho das propriedades, sendo 71,1% de bovinos ou bubalinos, 28,5% de pequenos ruminantes e 0,4% de suínos. Das mortes registradas, a causa predominante, segundo declaração dos proprietários, foi desnutrição (51%), seguida por intoxicação por plantas venenosas (10%), traumatismos e acidentes durante o manejo nas propriedades (8%), acidentes ofídicos (7%), ataque de animais (6%), problemas no parto ou ao nascimento (4%), entre outras.

Resultado dos testes laboratoriais para avaliação de anticorpos contra PNC

Os resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e por subpopulação amostral, estão sintetizados na Tabela 4. Do total de UPAs, em 88% (1.545) não foram identificados animais soropositivos ou com resultados indeterminados e nem com sinais clínicos indicativos de doença vesicular. As investigações prosseguiram nas 211 UPAs restantes (12% do total), das quais, 109 com pelo menos um bovino indeterminado e 102 com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante soropositivo. Nestas UPAs foram realizadas novas inspeções de vigilância e realizada coleta pareada.

Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta, por subpopulação amostral

Subpopulação	Amostra			Resultado das UPAs		Resultado dos bovinos ³		Pequenos ruminantes positivos ⁴
	UPAs	Bovinos	Pequenos ruminantes	Indeterminada ¹	Positiva ²	Indeterminado	Positivo	
1	350	11.838	0	34	6	37	6	0
2	350	10.828	0	12	0	12	0	0
3	350	8.152	4.280	23	39	33	4	44
4	356	9.321	2.550	25	24	28	6	21
5	350	8.701	3.058	15	33	26	11	38
Total	1.756	48.840	9.888	109	102	136	27	103

1. UPA indeterminada = UPA com pelo menos um bovino com resultado indeterminado ao teste confirmatório (EITB)

2. UPA positiva = UPA com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante com resultado positivo no teste laboratorial utilizado

3. Resultado do sistema I-ELISA 3ABC/EITB - 4. Resultado do teste ELISA 3ABC PrioCHECK®

Resultados referentes à coleta pareada, acumulados por subpopulação amostral, estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente para as UPAs classificadas como indeterminadas e como positivas após primeira coleta. Do total previsto de amostras para a coleta pareada, foi possível a coleta em 94,5% dos animais. Das 211 UPAs submetidas à coleta pareada, em nenhuma foi observado aumento significativo de animais soropositivos ou quaisquer indícios de transmissão viral. Destas, 5 UPAs permaneceram com persistência de pelo menos um bovino soropositivo e 27, com pelo menos um pequeno ruminante soropositivo. Das UPAs com pequenos ruminantes soropositivos, cinco que apresentaram todos bovinos negativos nas coletas 1 e 2, mas alternância de um pequeno ruminante soropositivo entre as referidas coletas, foram liberadas após inspeção final. As demais 5 UPAs com bovinos soropositivos e 22 UPAs com pequenos ruminantes soropositivos foram submetidas à investigação complementar, incluindo nova coleta pareada, exames clínicos e introdução de animais sentinelas.

Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à coleta pareada, nas UPAs sem animais soropositivos, mas com pelo menos um bovino indeterminado na coleta 1, por subpopulação amostral

Subpopulação	Amostra prevista			Amostra realizada			Resultado das UPAs ²		Resultado das amostras ²		
	UPAs	Bovinos	PR ¹	UPAs	Bovinos	PR ¹	Indeterminadas ³	Positivas ⁴	Bov ind ⁵	Bov pos ⁶	PR pos ⁷
1	34	1.333	0	34	1307	0	4	0	4	0	0
2	12	458	0	12	420	0	0	0	0	0	0
3	23	533	264	23	503	228	2	2	4	0	2
4	25	708	141	25	676	124	2	1	5	1	0
5	15	388	172	15	380	165	2	2	2	0	2
Total	109	3.420	577	109	3.286	517	10	5	15	1	4

1. PR = pequenos ruminantes; 2. Após coleta pareada; 3. UPA indeterminada = UPA com pelo menos um bovino com resultado indeterminado no sistema I-ELISA/EITB, sem animais soropositivos; 4. UPA positiva = UPA com pelo menos um bovino positivo no sistema I-ELISA3ABC/EITB ou pequeno ruminante com resultado positivo no teste I-ELISA 3ABC PrioCHECK®; 5 e 6. Bovinos com resultado indeterminado ou positivo no sistema I-ELISA3ABC/EITB, respectivamente; 7. PR com resultado positivo no teste I-ELISA 3ABC PrioCHECK®

Tabela 06. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante soropositivo na coleta 1, por subpopulação amostral

Subpopulação	Previsto			Realizado			Resultado das UPAs ²		Resultado das amostras ²		
	UPAs	Bovinos	PR ¹	UPAs	Bovinos	PR ¹	Indeterminada ³	Positiva ⁴	Bov ind ⁵	Bov pos ⁶	PR pos ⁷
1	6	236	0	6	232	0	0	1	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	39	889	822	39	847	729	1	9	1	1	8
4	24	597	428	24	571	373	1	6	1	2	6
5	33	820	660	33	802	624	2	11	9	1	13
Total	102	2.542	1.910	102	2.452	1.726	4	27	11	5	27

1. PR = pequenos ruminantes; 2. Após coleta pareada; 3. UPA indeterminada = UPA com pelo menos um bovino com resultado indeterminado no sistema I-ELISA/EITB, sem animais soropositivos; 4. UPA positiva = UPA com pelo menos um bovino positivo no sistema I-ELISA3ABC/EITB ou pequeno ruminante com resultado positivo no teste I-ELISA 3ABC PrioCHECK®; 5 e 6. Bovinos com resultado indeterminado ou positivo no sistema I-ELISA3ABC/EITB, respectivamente; 7. PR com resultado positivo no teste I-ELISA 3ABC PrioCHECK®

Investigação complementar e introdução de animais sentinelas

Nas 27 UPAs investigadas, foram introduzidos 45 animais sentinelas, sendo 18 UPAs com dois animais sentinelas e 9, com um animal sentinela. Os animais sentinelas permaneceram em convivência com os animais amostrados por, pelo menos, 30 dias em cada propriedade, sendo que todos os resultados das inspeções clínicas e testes laboratoriais foram negativos para FA.

Nas UPAs submetidas à investigação complementar foi realizada uma terceira coleta de amostras que envolveu 92% dos bovinos e 58% dos pequenos ruminantes que participaram da coleta anterior (segunda coleta pareada). Ao final dos testes laboratoriais, três UPAs permaneceram com pelo menos um bovino soropositivo e oito, com pelo menos um pequeno ruminante soropositivo. Nas UPAs onde houve persistência de animais soropositivos, mais uma vez não foram observados quaisquer sinais clínicos compatíveis com doença vesicular, nem aumento significativo de animais reagentes entre as coletas realizadas.

Especificamente em 8 UPAs que permaneceram com apenas um ou dois pequenos ruminantes soropositivos, destaca-se que também foram coletadas amostras de bovinos, e nas três coletas realizadas todos foram negativos aos testes laboratoriais para detecção de anticorpos

contra PNEs do vírus da FA. Esse ponto indica resultados falso-positivos nos pequenos ruminantes, uma vez que, no caso de transmissão do agente viral, também seria esperado resultados positivos nos bovinos, especialmente considerando o grupo etário estudado e o baixo histórico de vacinação.

Em todas as UPAs, a definição do número mínimo de bovinos e bubalinos até 24 meses (20 nas subpopulações 1 e 2, e 10 nas demais) foi atendida. De forma geral, 91,7% das UPAs (1.610/1.756) foram constituídas de uma propriedade; 6,6% (116/1.756), por duas propriedades; e 1,7% (30/1.756) por 3 a 5 propriedades. Considerando o total de UPAs investigadas e de animais amostrados, bem como os padrões epidemiológicos e estatísticos utilizados no delineamento do estudo, a sensibilidade final do sistema de investigação ficou em torno de 97% para cada subpopulação (EpiTools, 2014). Os valores médios, e respectivos desvios-padrão, para as sensibilidades de rebanho obtidas foram de 96,5% (dp 0,79%) na Subpopulação 1; 95,5% (dp 0,99%) na Subpopulação 2; 98,6% (dp 1,74%) na Subpopulação 3; 97,8% (dp 2,22%) na Subpopulação 4, e 97,8% (dp 2,05%) na Subpopulação 5.

Análise espacial

A distribuição espacial das 32 UPAs com pelo menos um animal soropositivo após a primeira coleta pareada pode ser avaliada na Figura 4, reforçando que as UPAs constituídas por mais de uma propriedade rural, estão representadas pelo ponto central obtido a partir das coordenadas geográficas das propriedades de cada UPA. A análise de formação de *clusters* foi realizada de forma separada para as subpopulações amostrais onde foram identificados animais soropositivos (subpopulações 1, 3, 4 e 5). Para a Subpopulação 1, a análise espacial considerou apenas os resultados após a primeira coleta (6 UPAs com animais soropositivos), tendo em vista que após a coleta pareada somente uma UPA permaneceu com um animal soropositivo. Para as Subpopulações 3, 4 e 5, as análises foram realizadas considerando tanto os resultados após a primeira coleta pareada como os resultados finais do estudo. Para estas três subpopulações também foi realizada análise conjunta dos resultados. Em todos os cenários considerados não foi constatada a formação de *clusters*, ao nível de significância de 5%. Deve-se destacar que nas subpopulações consideradas, a análise de proximidade entre as UPAs revelou compatibilidade para formação de *clusters*, no caso de haver transmissão do vírus da FA, uma vez que 89% das UPAs na subpopulação 1 e 87%, nas subpopulações 3, 4 e 5, apresentavam vizinho mais próximo em intervalo inferior a 20 km, incluindo, entre estas, 30 das 32 UPAs com animais soropositivos consideradas na análise espacial.

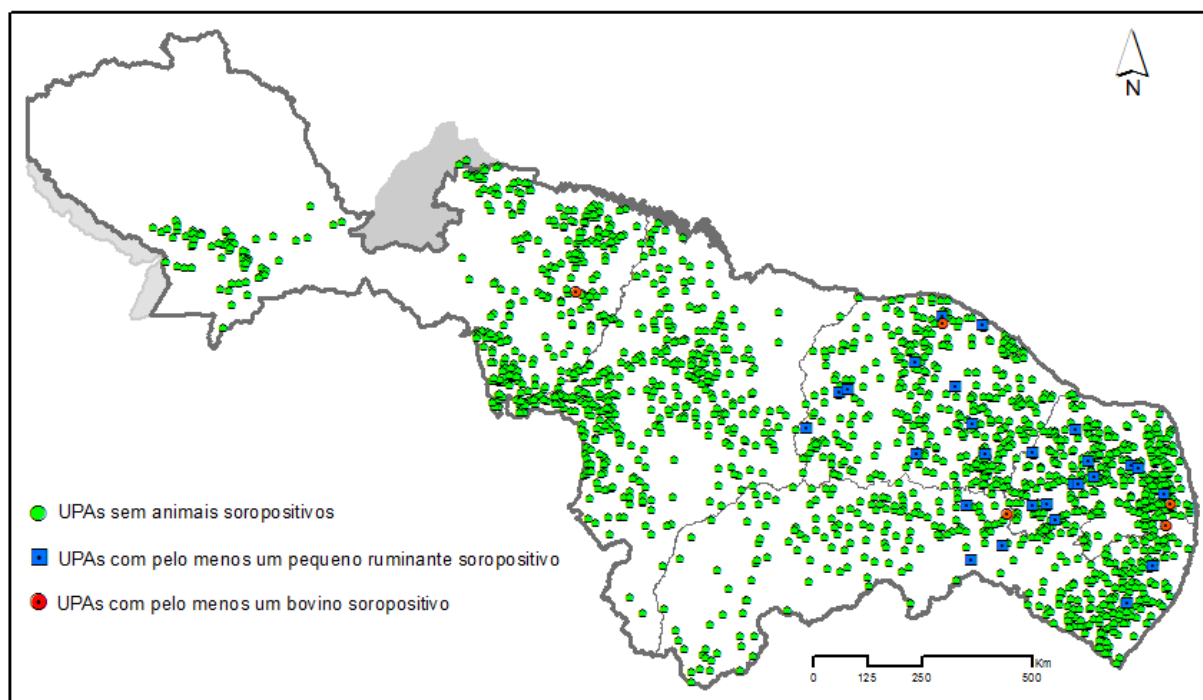


Figura 04. Distribuição geográfica das UPAs, com destaque para UPAs com pelo menos um bovino ou pequeno ruminante soropositivo após a coleta pareada.

Discussão

Conforme destacado inicialmente, países que utilizam a estratégia de vacinação contra a FA em seus rebanhos, de forma massiva e sistemática, apresentam grandes dificuldades para demonstração de sua condição zoossanitária, uma vez que: inspeções clínicas apresentam valor limitado, em função da possibilidade de ocorrência subclínica da doença; testes laboratoriais para detecção de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus da FA têm reduzida utilidade; e testes para detecção de anticorpos contra PNEs, quando avaliados individualmente, não permitem, de forma evidente, diferenciar infecção e vacinação. Considerando referida dificuldade, países nesta condição devem fortalecer seus sistemas de vigilância e ampliar suas ferramentas metodológicas, visando a demonstração de ausência de transmissão do vírus da FA, com o maior nível de confiança possível. Neste sentido, estudos epidemiológicos, especialmente do tipo transversal, têm sido utilizados em apoio tanto aos pleitos de reconhecimento de país ou zona livre de FA com vacinação junto à OIE, como nas negociações com países importadores, sempre destacando que referidos estudos devem ser vistos como instrumentos complementares, e não de substituição, dos sistemas de vigilância implantados e sob controle dos serviços veterinários oficiais.

Como contribuição ao delineamento de estudos epidemiológicos, o presente trabalho apresentou uma experiência brasileira na demonstração de ausência de transmissão do vírus da FA. Neste estudo, ações de vigilância longitudinal, que incluem intensas atividades de inspeção e exames clínicos, foram mescladas a atividades de coletas de amostras para avaliação de

anticorpos contra PNEs, dirigidas a localidades, rebanhos e grupos etários de maior probabilidade de infecção pelo agente viral, na hipótese de ocorrência da doença. Importantes elementos metodológicos, como análise de redes de movimentação animal e utilização de fatores de risco para FA, foram incorporados ao trabalho, apoiando e trazendo maior confiança e objetividade às definições e às tomadas de decisão fundamentadas no conhecimento epidemiológico da doença.

A análise da movimentação animal apresentou-se de grande utilidade para identificação de áreas específicas de estudo, principalmente em regiões de grande heterogeneidade e dimensão geográfica. Uma vez os dados de movimentação animal estando disponíveis, em quantidade e qualidade representativa da área envolvida, a metodologia utilizada para identificação de comunidades ou, no presente caso, de circuitos de comercialização bovina, apresenta-se como ferramenta prática e objetiva para utilização pelo serviço veterinário oficial, não dispensando, entretanto, a validação por profissionais com conhecimento da região. A opção pela análise da movimentação animal compilada por municípios e microrregiões geográficas, agregou dois importantes elementos ao trabalho: redução expressiva do esforço computacional, viabilizando a análise de diferentes cenários de forma mais prática e rápida; e incorporação de elementos socioeconômicos e de contiguidade geográfica na definição das subpopulações amostrais, de acordo com Lemos (2003) e IBGE (2011).

Ainda em relação à metodologia de análise da movimentação animal, deve-se destacar que, considerando o objetivo do estudo, o conceito de circuito de comercialização bovina utilizado, de forma distinta à definição proposta por Grisi-Filho et al. (2013), não incluiu o destino final para abate, uma vez que esta finalidade não representa risco significativo para difusão da doença e a movimentação com destino a abatedouros, concentrados em determinadas localidades, poderia descaracterizar ou mascarar fluxos predominantes entre propriedades rurais. Portanto, a definição utilizada considerou a identificação de espaços geográficos com maior probabilidade do bovino ou bubalino nascer e ser comercializado entre propriedades rurais, ou seja, antes do envio ao abate.

No caso dos fatores de risco utilizados, a seleção de estabelecimentos rurais de maior probabilidade para a doença ficou limitada à estrutura do rebanho bovino, dando-se prioridade aos rebanhos com maior proporção de animais jovens. A caracterização das propriedades foi realizada através da análise pontual do banco de dados de cadastro de propriedades rurais, o que apresenta importantes limitações. Portanto, essa atividade, em específico, pode ser fortalecida com utilização de indicadores complementares como, por exemplo, caracterização do sistema produtivo predominante, frequência de comercialização animal (análise de ingresso e egresso em determinado período de tempo), localização geográfica e opinião dos profissionais

locais. Independente das estratégias e indicadores utilizados para caracterização de regiões e propriedades rurais de maior risco para FA, o processo deve estar apoiado em sistemas de informação que permitam o registro, a coleta e o processamento de dados representativos dos sistemas e práticas de produção predominantes.

Quanto aos resultados dos testes laboratoriais utilizados para identificação de anticorpos contra PNEs, os percentuais de soropositivos observados no estudo, tanto em bovinos e bubalinos, como em pequenos ruminantes, são compatíveis com os padrões de especificidade indicados na literatura e nos manuais das empresas produtoras dos Kits utilizados (GORIS et al. 2007; BROCCHI et al., 2006; PANAFTOSA, 2012a,b). Considerando os resultados positivos obtidos após a primeira coleta, a especificidade combinada do uso em série dos testes ELISA 3ABC PANAFTOSA (subpopulações 1 e 2) e PrioCHECK[®] (subpopulações 3, 4 e 5), com o teste EITB do PANAFTOSA, neste estudo girou em torno de 99,9%. Incluindo os resultados indeterminados, sobre os quais não há informações de reatividade publicadas pelos fabricantes ou mesmo na literatura científica, a especificidade observada no estudo foi de 99,7% nas subpopulações 1 e 2, e de 99,6% nas subpopulações 3, 4 e 5. No caso de pequenos ruminantes, a especificidade do teste ELISA 3ABC PrioCHECK[®], observada no estudo ao final da coleta 1, foi de 99%, valor próximo ao limite inferior do IC95% observado por Brocchi et al. (2006). Ainda em relação aos pequenos ruminantes, destaca-se que nas UPAs onde permaneceram animais soropositivos ao final do estudo, estes estiveram em contato com bovinos que apresentaram resultados negativos aos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, em três coletas consecutivas, bem como com animais sentinelas inseridos na fase final do estudo, o que reforça a constatação de resultados falso-positivos nestas espécies.

A estratégia de introdução de animais sentinelas nas UPAs com persistência de animais soropositivos ao final do estudo foi utilizada pela primeira vez no país, em substituição à coleta de líquido esofágico-faríngeo para pesquisa viral, técnica que apresenta reconhecida baixa sensibilidade. Entretanto, apesar da estratégia ter apresentado resultados satisfatórios no presente estudo, demonstrando de forma inequívoca a ausência de transmissão viral, seu emprego deve ser avaliado com cautela, considerando a complexidade das atividades que envolvem sua realização, com destaque para seleção, transporte e manutenção dos animais em diferentes localidades. Há, também, a questão relativa à falta de especificidade do sistema laboratorial para detecção de anticorpos contra PNEs, podendo produzir resultados falso positivos o que, no caso dos sentinelas, pode ser esclarecido com a utilização de testes para titulação de anticorpos contra proteínas estruturais do vírus da FA, apesar de ser pouco provável a ocorrência de transmissão do agente viral sem manifestação clínica da doença.

Agradecimentos

Estudos epidemiológicos, como o descrito neste trabalho, somente são possíveis com a participação de número expressivo de profissionais, responsáveis por diferentes atividades de coordenação e execução. Dessa forma, o autor gostaria de reconhecer e agradecer a participação dos profissionais dos serviços veterinários oficiais localizados nos estados envolvidos no trabalho e dos profissionais da rede oficial de laboratórios do Ministério da Agricultura, responsáveis pela realização dos testes laboratoriais.

Referências

ASTUDILLO, V., DORA J. F. e SILVA A. J. M., 1986: Ecosistemas y estrategias regionales de control de la fiebre aftosa. Aplicación al caso de Rio Grande do Sul, Brasil / Ecosystems and regional strategies for foot-and-mouth disease control. Application to the case of Rio Grande do Sul, Brazil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**; 52: 47-78. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Bol52-p63-77ingAstudillo.pdf>.

ASTUDILLO, V., 1984: Formas de organização da produção como determinantes de risco de febre aftosa. **A Hora Veterinária**, ano 3, n. 17, 11-20. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Astudillo-formas-producao-HoraVet-1984.pdf>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2013: **Request for recognition of the states of Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, and the northern region of the state of Pará, as a FMD free zone with vaccination**. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2008a: **Instrução Normativa, n. 50, de 23 de setembro de 2008**. Aprova o Regulamento Técnico para a Produção, Controle da Qualidade, comercialização e Emprego de Vacinas Contra a Febre Aftosa. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2008b: **Application for restoration of recognition of FMD-free zone with vaccination status**. Report presented to the World Organisation for Animal Health - OIE, requesting the restitution of the recognition of the sanitary status of FMD-free zone with vaccination for the area constituted by the states of Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe and Tocantins. Brasília, DF, April, 49 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2006: **Instrução Normativa, n. 18, de 18 de julho de 2006**. Aprova o modelo da Guia de Trânsito Animal (GTA) a ser utilizado em todo o território nacional para o trânsito de animais vivos, ovos férteis e outros materiais de multiplicação animal. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2002: **Elimination of the outbreaks of the FMD occurred in the state of Rio Grande do Sul, Brazil**. Report to the FMD and other Epizooties Commission of the Animal World Health Organization – OIE – aiming the restitution of the sanitary condition of the FMD free zone with vaccination for the Sates of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Brasília, DF: October, 2002, 199 p.

BRITO, B.P., RODRIGUEZ, L. L., HAMMOND, J. M., PINTO, J., e PEREZ, A. M., 2015: Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. **Transbound Emerg Dis.** May 20. doi: 10.1111/tbed.12373.

BROCCHI, E., BERGMANN I. E., DEKKER, A., PATON, D.J., SAMMIN D. J., GREINER M., GRAZIOLI, S., SIMONE, F., YADIN, H., HAAS, B., BULUT, N., MALIRAT, V., NEITZERT, E., GORIS, N., PARIDA, S., SØRENSEN, K. e CLERCQ, K., 2006: Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. **Vaccine** 24, 6966–6979. doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.050.

CAETANO JUNIOR, J. (1996). **Avaliação de risco nos focos de febre aftosa em bovinos: Minas Gerais, 1992 a 1994.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 68 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

CAMERON, A. R. e F. BALDOCK, C., 1998: Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine** 34, 19-30.

CAPORALE, V., GIOVANNINI, A. e ZEPEDA, C., 2012: Surveillance strategies for foot and mouth disease to prove absence of disease and absence of viral circulation. **Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.**, 31(3), 747-759.

CLAVIJO, A., WRIGHT, P. e KITCHING, P., 2004: Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. **The Veterinary Journal** 167, 9–22. doi:10.1016/S1090-0233(03)00087-X.

CLAVIJO, A., SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J., BUZANOVSKY, L. P., MARTINI, M., POMPEI, J. C. e COSIVI, O., 2015: Current Status and Future Prospects to Achieve Foot-and-Mouth Disease Eradication in South America. **Transboundary and Emerging Diseases.** doi:10.1111/tbed.12345

CLERCQ, K. e PATON, D., 2009: Interpretation of results of foot and mouth disease surveillance to distinguish between vaccinated and infected cattle. **Proceedings of the First OIE/FAO Global Conference on Foot and Mouth Disease: The Way Towards Global Control.** 24-26 June 2009. Asunción, Paraguay. P 135-140.

DSA (Departamento de Saúde Animal), 2007. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Vigilância veterinária de doenças vesiculares; orientações gerais.** Brasília, DF, out de 2007, 49 p. (disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20aftosa/vigilancia%20veterinaria.pdf)

DORA, J. F. P. e PETRY, M. C., 1984: Importância epidemiológica das espécies animais em febre aftosa. **A Hora Veterinária.** Porto Alegre, v. 3, n. 17, p. 53-59.

EPITOOLS, 2014: Website (available at <http://epitools.ausvet.com.au/>)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014: Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease. **FAO Animal Production and Health Manual** n. 17. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-108637-7. 199 pp.

ERIC M. FÈVRE, E. M, BRONSVOORT, B. M. C, HAMILTON, K. A. e CLEVELAND, S., 2006: Animal movements and the spread of infectious diseases. **TRENDS in Microbiology**, v.14, n. 3, March

GARLAND, A.J.M. e CLERCQ, K., 2011: Cattle, sheep and pigs vaccinated against foot and mouth disease: does trade in these animals and their products present a risk of transmitting the disease? **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 30 (1), 189-206

GONÇALVES, V. S. P., SILVA, A. M. e MORAES, G. M., 2003: Random Sample Surveys Conducted in Brazil with a View to Substantiating the Expansion of the Free Zone of Foot-And-Mouth Disease where Vaccination is Practised. **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**. Available at www.sciquest.org.nz

GORIS, N., PRAET, N., SAMMIN, D., YADIN, H., PATON, D., BROCCHI, E., BERVENS, D. e DE CLERCQ, K., 2007: Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELSIA tests and true prevalence in the field. **Vaccine**, 25, 7177-7196.

GREINER, M. e DEKKER A., 2005. On the surveillance for animal diseases in small herds. **Preventive Veterinary Medicine** 70, 223–234. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.03.007

GRISI-FILHO, J.H.H., AMAKU, M., FERREIRA, F., DIAS, R. A., FERREIRA NETO, J.S.F., NEGREIROS, R.L. e OSSADA, R., 2013: Detecting livestock production zones. **Preventive Veterinary Medicine** 110, 304–311. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.12.013

HAMMOND, J. M.; FERRIS, N. P.; LI YANMIN; KNOWLES, N. J.; KING, D. P. e PATON, D. J., 2009: The global situation of foot and mouth disease occurrence – an overview. **Proceedings of the First OIE/FAO Global Conference on Foot and Mouth Disease: The Way Towards Global Control**. 24-26 June 2009. Asunción, Paraguay. P 11-20.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2011: **Base de informações do Censo Demográfico 2010: Resultados do Universo por setor censitário**. Rio de Janeiro, 125 p.

JAMAL, S. M. e BELSHAM, G. J., 2013: Foot-and-mouth disease: past, present and future. **Veterinary Research**, 44:116 <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/116>

KIM, Y., SON, S.-W. e JEONG, H., 2010: Finding communities in directed networks. **Phys. Rev. E** 81, 1–9. doi:10.1103/PhysRevE.81.016103

KIRKPATRICK, S., GELATT, C.D.J. e VECCHI, M.P., 1983: Optimization by Simulated Annealing. **Science** (80-). 220, 671–680. doi:10.1126/science.220.4598.671

KITCHING R.P, 2002a: Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz**, 21 (3), 531-538.

KITCHING R.P., 2002b: **Foot and mouth disease diagnostics: requirements for demonstration of freedom from infection**. OIE General Session; 2002. <http://dx.doi.org/10.1016/0264-> <http://www.oie.int/doc/ged/D32.PDF>

- KITCHING, R.P., HUTBER, A.M. e THURFIELD M.V., 2005: A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease. **The Veterinary Journal** 169, 197–209. doi:10.1016/j.tvjl.2004.06.001
- KNIGHT-JONES, T. J. D. e RUSHTON, J., 2013: The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? **Preventive Veterinary Medicine**, 112, 161 – 173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.013>
- KULLDORFF, M. e Information Management Services, Inc. SaTScan™ v8.0, 2009: **Software for the spatial and space-time scan statistics**. [www.satscan.org].
- KULLDORFF, M., 1997: A spatial scan statistic. **Communications in Statistics: Theory and Methods**, 26:1481-1496, 1997
- LEMONS, M. B., DINIZ, C. C., GUERRA, L. P. e MORO, S., 2003: A Nova Configuração Regional Brasileira e sua Geografia Econômica. **Est. Econ.**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 665-700.
- MCLAWS, M. e RIBBLE, C., 2007: Description of recent foot and mouth disease outbreaks in nonendemic areas: Exploring the relationship between early detection and epidemic size. **CVJ**, v. 48, Oct., 1051-1062.
- MARTIN, P. A. J., CAMERON, A. R. e GREINER, M., 2007: Demonstrating freedom from disease using multiple complex data source. 1: A new methodology based on scenario trees. **Preventive Veterinary Medicine**, 79, 98-115.
- MARTIN, S. W., SHOUKRI, M. e THORBURN, M. A., 1992: Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, 14, 33-43. doi:10.1016/0167-5877(92)90082-Q.
- MATHIAS, L. A., MOREIRA, E. C., ROSENBERG, F. J. e OBIAGA, J. A., 1981: Estudio serológico de fiebre aftosa em bovinos procedentes del Pantanal Matogrosense, Brasil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, 41-42: 3-8.
- MELO, E. C. e LÓPEZ A., 2002: Control of foot and mouth disease: the experience of the Americas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 21 (3), 695-698
- MORAES, G. M., 1993: Los circuitos de comercialización bovina como elementos de intervención sanitaria. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**. v. 59, p. 29-36.
- NARANJO, J. e O. COSIVI, 2013: Eradication of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. **Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.** 368, 20120381. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0381>
- NEGREIROS, R. L., AMAKU, M., DIAS, R. A., FERREIRA, F., CAVALLÉRO, J. C. M. e FERREIRA NETO, J. S., 2009: Spatial clustering analysis of the foot-and-mouth disease outbreaks in Mato Grosso do Sul state, Brazil – 2005. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.9, p.2609-2613.

OBIAGA, J.A.; ROSEMBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M. e GOIC R. M., 1979: Characteristics of livestock production as determinant of foot-and-mouth disease ecosystems. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, n. 33-34, p. 43-52.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2017: **Terristrial Animal Health Code**, Volume 2, Chapter 8.8 Foot-and-Mouth Disease.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2014: **Guide to terrestrial animal health surveillance**. ISBN 978-92-9044-842-6. 108 pp.

OLASCOAGA, R.C.; GOMES I.; ROSENBERG, F.J.; MELLO, P. A.; ASTUDILLO. V. e MAGALLANES N., 1999: **Fiebre Aftosa**. São Paulo: Editora Atheneu, 458 p.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2010: Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease – PHEFA, **Action Plan 2011-2020**. Approved Document – 15-12-2010. 46 p.
<http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/PHEFA-PlanAccion-2011-2020ing.pdf>

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2015: **Informe tecnico de la 41ª reunión ordinaria de la comisión sudamericana para la lucha contra la fiebre aftosa** (Cosalfa). Lima, Peru.

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012a: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa Prueba Confirmatoria, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012.
http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012b: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa, Prueba Tamiz, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012.
http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PARTHIBAN A. B. R., MAHAPATRA M., GUBBINS S. e PARIDA S., 2015: Virus Excretion from Foot-And- Mouth Disease Virus Carrier Cattle and Their Potential Role in Causing New Outbreaks. **PLoS ONE** 10(6): e0128815. doi:10.1371/journal.pone.0128815

PATON, D. J., FÜSSEL, A. E., VOSLOO, W., DEKKER, A. e CLERCQ, K., 2014: The use of serosurveys following emergency vaccination, to recover the status of “foot-and-mouth disease free where vaccination is not practiced”. **Vaccine** 32, 7050-7056.

PATON, D. J., CLERCQ, K, GREINER, M., DEKER, A., BROCCHI, E., BERGMANN, I., SAMMIN, D. J., GUBBINS, S. e PARIDA, S., 2006: Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle. **Vaccine** 24 6503–6512. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.032

PATON, D.J., DE CLERCQ, K. e DEKKER, A., 2004. **Post-vaccinal Serosurveillance for FMD: A European Perspective on Progress and Problems**, <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App76.pdf>.

PEREZ, A. M., WARD, M. P. e CARPENTER, T. E., 2004a: Control of a foot-and-mouth disease epidemic in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine** 65, 217–226. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.08.002

PEREZ, A. M., WARD, M. P. e CARPENTER, T. E., 2004b: Epidemiological investigations of the 2001 foot-and-mouth disease outbreak in Argentina. **Veterinary Record**, 154, 777-782.

REVISÃO da Política e Estratégias de Combate à Febre Aftosa Implantadas pelo Projeto de Controle das Doenças dos Animais, 1992:. Elaboração: Grupo de Trabalho Criado pela Portaria N° 68, de 22 de julho de 1992, do Secretário Nacional de Defesa Agropecuária. Brasil, set.

ROSENBERG F. J. e MELLO A. P., 1974: Portadores de virus aftoso. Proceso terminal de la infección o eslabón intermedio en la cadena epidemiológica de la enfermedad? **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**; 13-16: 50-60.

SARAIVA, V. E. V., 2009: Foot and mouth disease and control strategies in South America – the current situation. **Proceedings of the First OIE/FAO Global Conference on Foot and Mouth Disease: The Way Towards Global Control**. 24-26 June 2009. Asunción, Paraguay. P 32-39.

SERGEANT, E. S. G., 2015: **Epitools epidemiological calculators**. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.

SUTMOLLER, P. e OLASCOAGA R. C., 2002a: Unapparent foot and mouth disease infection (sub-clinical infections and carriers): implications for control. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 21 (3), 519-529.

SUTMOLLER, P. e OLASCOAGA R. C., 2002b: **The successful control and eradication of Foot and Mouth Disease epidemics in South America in 2001**. Evidence for the Temporary Committee on Foot-andMouth Disease of the European Parliament, Meeting 2 September 2002, Strasbourg. Presented by Dr Paul Sutmoller.

TENZIN, DEKKER A., VERNOOIJ H., BOUMA A. e STEGEMAN A., 2008: Rate of foot-and-mouth disease virus transmission by carriers quantified from experimental data. **Risk Analysis**, Vol. 28, No. 2, DOI: 10.1111/j.1539-6924.2008.01020.x.

TERRAVIEW 4.2.2, 2010: São José dos Campos, SP: INPE, 2010: Disponível em: www.dpi.inpe.br/terraview. Acesso em: 8/06/2015.

WARD, M. P. e PEREZ, A. M., 2004: Herd demographics correlated with the spatial distribution of a foot-and-mouth disease epidemic in Buenos Aires province, Argentina. **Preventive Veterinary Medicine** 65, 227–237. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.08.003.

ZILLER, M., SELHORST, T., TEUFFERT, J., KRAMER, M. e SCHLÜTER, H., 2002: Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. **Preventive Veterinary Medicine** 52, 333–343.

Capítulo 4

AValiação DE TRANSMISSÃO VIRAL EM ZONA LIVRE DE FEBRE AFTOSA COM VACINAÇÃO, BRASIL, 2014/2015

Resumo

O artigo apresenta os resultados do estudo de avaliação de transmissão viral conduzido na zona livre de febre aftosa (FA) com vacinação do Brasil, entre 2014 e 2015. Utiliza fatores de risco com objetivo de potencializar a detecção do agente viral, e emprega a análise da movimentação animal para definição de subpopulações amostrais, o que aumenta a sensibilidade da investigação e reduz custos operacionais. A área de estudo envolveu 15 estados, mais parte do Amazonas e Pará, representando 5,2 milhões de km². Esta área foi dividida em cinco subpopulações amostrais com base na identificação dos circuitos de comercialização bovina a partir da análise da movimentação bovina em 2012 e 2013. A avaliação de transmissão viral foi dirigida a bovinos ou bubalinos de 6 a 12 meses de idade, oriundos de propriedades rurais com maior concentração e tendência de comercialização desses animais, localizadas em municípios com maior intensidade de movimentação de bovinos ou bubalinos. Em cada subpopulação amostral foi realizado, de forma independente, estudo de detecção em duas etapas, mesclando investigação transversal e atividades longitudinais de avaliação clínica e de coleta de amostras de soro sanguíneo, para identificação de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA. Todo o estudo envolveu 1.705 unidades primárias de amostragem (UPAs) e 47,524 animais amostrados. Os resultados dos testes laboratoriais para avaliação de anticorpos contra PNEs, apoiados nas investigações complementares, mostraram-se incompatíveis com transmissão viral. Foram realizadas análises espaciais para identificação de *clusters*, observando padrão aleatório para distribuição das UPAs com presença de animais soropositivos ou indeterminados. Entre as subpopulações amostrais, a sensibilidade do estudo variou de 95.4% a 97.4% e a probabilidade de livre, para todas as subpopulações, ficou em torno de 99,5%, considerando prevalência a priori conservadora de 10%. O custo geral do estudo, considerando apenas gastos diretos, representou um valor médio de US\$ 392.04 por UPA ($SD = US\$ 162.42$) e de US\$14.28 por animal amostrado ($SD = US\$ 5.64$).

Palavras-chave: FMD, vigilância baseada em risco, testes DIVA, fatores de risco, proteína não-estrutural

Introdução

O Brasil encerrou 2016, ano seguinte à realização deste trabalho, com 77% do seu território (aproximadamente 6,5 milhões de km²) reconhecido pela Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, como livre de febre aftosa – FA (OIE, 2016a), contemplando 99% do seu rebanho doméstico susceptível à doença (PANAFTOSA, 2016). Da região com reconhecimento de livre, 97% possuem status de zona livre com vacinação, e os demais 3% (representados pelo estado de Santa Catarina) possuem status de zona livre sem vacinação.

O país, com base nas diretrizes do Plano Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa, busca consolidar o processo de erradicação da doença por meio da incorporação do restante da Região Amazônica à zona livre, e através do fortalecimento do sistema de vigilância, com vistas à suspensão da vacinação (PANAFTOSA, 2011). Para isso, estão em curso atividades coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, com participação do Centro Pan-americano de Febre Aftosa - PANAFTOSA, dos serviços veterinários estaduais, de setores privados ligados à produção e indústria pecuária e de centros acadêmicos do país. As orientações gerais para a revisão do sistema de vigilância estão resumidas no Guia Técnico de Trabalho elaborado pelo PANAFTOSA e por representantes dos serviços veterinários dos países da América do Sul (PANAFTOSA, 2015), e as bases técnicas estão fundamentadas, principalmente, nos recentes guias e manuais sobre vigilância disponibilizados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, e OIE (FAO, 2011 e 2014; OIE, 2014).

Na América do Sul, as bases do sistema de informação e vigilância para FA foram estabelecidas na década de 1970 (OLASCOAGA, 1982; ASTUDILLO, 1983; MENDES et al., 2011). Esse sistema está fundamentado em uma rede de atenção a ocorrências de doenças vesiculares, tendo como elementos principais a vigilância passiva reforçada e sindrômica e a manutenção de estruturas locais de vigilância, coordenadas pelo serviço veterinário oficial, responsáveis por: cadastro de explorações pecuárias; fiscalização e controle da movimentação animal; atendimento a notificações de suspeitas de doenças vesiculares; inspeção a propriedades rurais; fiscalização das etapas de vacinação contra a FA (incluindo a cadeia de frios representada pelas revendas de produtos veterinários); fiscalização de eventos agropecuários; entre outras. À essa estrutura de vigilância agregam-se atividades de inspeção e fiscalização em abatedouros e em postos de controle localizados em portos, aeroportos e pontos específicos da fronteira internacional e das divisas estaduais.

Especialmente a partir da década de 1990, com o estabelecimento do conceito de zonificação pela OIE (OIE, 1992), ao tradicional sistema de vigilância para FA implantado nos países da América do Sul foi adicionada a realização de estudos epidemiológicos visando apoiar a certificação de ausência de transmissão viral e o reconhecimento internacional do status de livre da doença. Esses estudos tornaram-se mais frequentes devido, principalmente, às dificuldades ou limitações para quantificar e avaliar a eficácia e o desempenho dos componentes tradicionais do sistema de vigilância em relação à capacidade de detecção da doença, conforme discutido por Martin et al. (2007). No Brasil, em específico, no período de 1995 a 2015, foram realizados 38 estudos em diferentes localidades, visando o reconhecimento, a manutenção ou a restituição do status de zona livre de FA. Entretanto, estudos epidemiológicos realizados em países ou zonas livres de FA com vacinação apresentam dificuldades adicionais, uma vez que, apesar dos avanços na produção científica sobre a doença nas últimas décadas, ainda persistem desafios relacionados à capacidade de diferenciar, por meio de testes sorológicos, animais infectados dos vacinados, e dúvidas quanto à importância epidemiológica de portadores para manutenção ou transmissão do agente viral (KNIGHT-JONES et al., 2016).

Visando contribuir com a definição de estratégias para demonstração de ausência de transmissão do vírus da FA em localidades que utilizam a vacinação de forma massiva e sistemática, o presente artigo descreve a metodologia e apresenta os resultados de estudo conduzido na zona livre de FA com vacinação do Brasil, entre 2014 e 2015. O estudo foi realizado com objetivo de apoiar a demonstração de ausência de transmissão viral, de acordo com compromissos firmados com a OIE e países importadores. Na zona livre avaliada, os últimos episódios de FA foram registrados no período de outubro de 2005 a abril de 2006, nos estados do Mato Grosso do Sul e do Paraná, envolvendo região de fronteira internacional. Esta última ocorrência foi causada pelo sorotipo O, limitando-se ao rebanho bovino da localidade. O trabalho faz uso de elementos de risco para FA, como forma de potencializar a detecção do agente viral, conforme destacam Caporale et al. (2012) e FAO (2014), e da análise da movimentação animal para definição de subpopulações amostrais, aumentando a sensibilidade da investigação e permitindo a redução de custos operacionais em estudos realizados em grandes áreas geográficas.

Material e métodos

Época do estudo e área geográfica envolvida

O trabalho foi coordenado pelo MAPA, e executado pelos serviços veterinários dos estados envolvidos. O delineamento ocorreu no primeiro semestre de 2014, incluindo a elaboração de manuais e a realização de reuniões técnicas de validação e padronização das atividades. Os trabalhos de campo foram iniciados em maio de 2014, com as atividades de coleta de amostras, vigilância e de investigação complementar conduzidas até outubro de 2015.

A área incluída no estudo envolveu unidades da Federação que ao final de 2013 possuíam reconhecimento internacional de zona livre de FA com vacinação, constituída por 15 estados, mais parte dos estados do Amazonas e do Pará (Figura 1). Representou uma área de 5,2 milhões de km², contendo um total aproximado de 180 milhões de bovinos distribuídos em 1,9 milhão de propriedades rurais. Entre os estados participantes, a média estadual de bovinos por propriedade variou de 30 animais em Sergipe a 346 no Mato Grosso do Sul, e o percentual de bovinos jovens (< 12 meses), por estado, variou de 15% na Bahia a 25% em São Paulo. Quanto às demais espécies domésticas susceptíveis à FA, destacava-se a existência de, aproximadamente, 33 milhões de suínos, distribuídos em granjas comerciais e de subsistência, 27 milhões de pequenos ruminantes e 1 milhão de bubalinos.

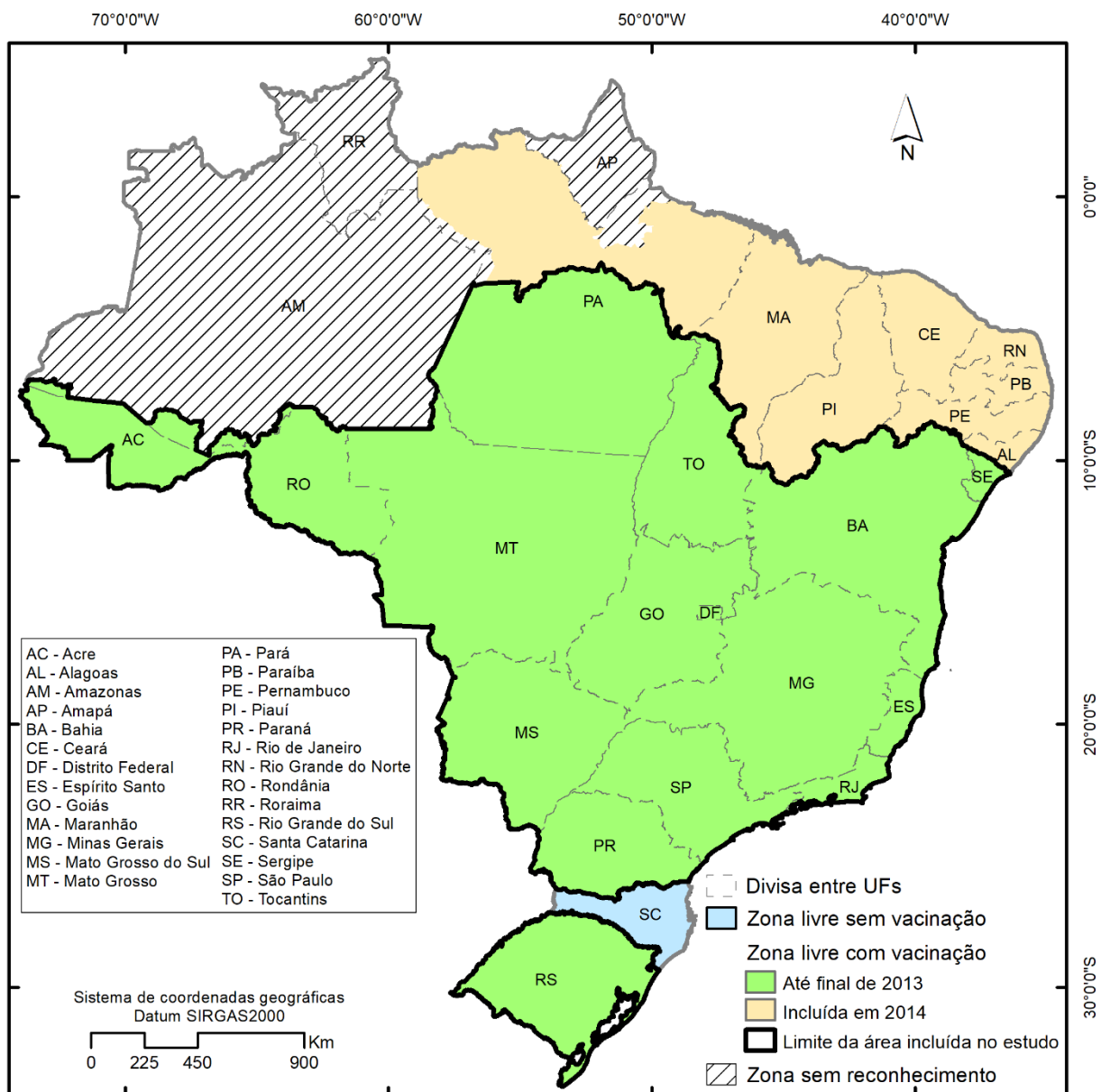


Figura 01. Condição zoossanitária para febre aftosa no Brasil, ao final de 2016, com destaque para a área envolvida no estudo

Metodologia

Configuração do espaço de investigação (definição das subpopulações amostrais)

Como se observa na Figura 1, a área geográfica é muito extensa, não sendo adequado generalizá-la como única população de estudo para avaliação de transmissão viral, uma vez que não há relação epidemiológica direta entre todo espaço amostral considerado. Assim, subdividiu-se a região em unidades geográficas menores para realização de estudos independentes visando a detecção de transmissão viral, aumentando a sensibilidade e representatividade populacional.

Para definição desses espaços geográficos específicos, ou subpopulações amostrais, uma possibilidade seria considerar cada um dos 15 estados envolvidos, mais parte dos estados do Amazonas e do Pará, como populações independentes para detecção de transmissão viral, entretanto, essa abordagem desconsidera as características epidemiológicas da doença, produzindo elevado esforço amostral e gerando custos desnecessários. Como alternativa, buscou-se apoio na base teórica estabelecida nas décadas de 1970 e 1980, na América do Sul, relacionada à caracterização dos ecossistemas de FA e sua relação com as práticas comerciais da produção pecuária (OBIAGA ET AL., 1979; ASTUDILLO, 1984; ASTUDILLO et al., 1986). Essa abordagem teórica orientou a adoção diferenciada de atividades de controle e erradicação por regiões, e apoiou a implantação das zonas livres da doença no Brasil. Dessa forma, a definição das subpopulações amostrais concentrou-se nas práticas comerciais e na distribuição dos rebanhos bovinos, reconhecida espécie de importância epidemiológica para manutenção e disseminação das cepas virais prevalentes na região (DORA et al., 1984; OLASCOAGA et al., 1999).

De forma objetiva, para considerar o fluxo geográfico e temporal das práticas comerciais da produção bovina em apoio à delimitação das subpopulações amostrais, foi utilizado o banco de dados de movimentação animal entre propriedades rurais, referente aos anos de 2012 e 2013. No Brasil, a movimentação de animais de interesse pecuário somente é autorizada por meio da emissão de guias de trânsito animal, que contêm informações como origem, destino, finalidade da movimentação, quantidade de animais movimentados, por espécie e faixa etária (BRASIL, 2006). Optou-se por trabalhar com uma série histórica de dois anos para representar, pelo menos, um ciclo produtivo de comercialização de bovinos entre propriedades rurais, e, dessa forma, estimar uma tendência geográfica e temporal de comercialização animal. O banco de dados envolveu 6,5 milhões de movimentações de, aproximadamente, 149,5 milhões de bovinos e bubalinos entre propriedades rurais. Animais enviados para abate não foram considerados no estudo, uma vez que não representam risco significativo para transmissão ou manutenção da doença entre rebanhos.

As movimentações foram organizadas por municípios e microrregiões geográficas e foi utilizada a metodologia para detecção de circuitos pecuários proposta por Grisi-Filho et al. (2013). Os municípios constituem as unidades geográficas autônomas de menor hierarquia dentro da organização político-administrativa do Brasil e as microrregiões geográficas significam um conjunto de municípios, contíguos e contidos em um mesmo estado, definidas com base em características do quadro natural, da organização da produção e de sua integração socioeconômica (LEMOS, 2003; IBGE, 2011).

Esta metodologia permite, através da análise do trânsito animal e utilizando teorias da área de redes complexas, descobrir quais são os grupos de localidades onde um animal tem maior probabilidade de permanecer do seu nascimento até sua fase final de engorda ou descarte, envolvendo o ciclo produtivo entre propriedades rurais. A avaliação final da qualidade dos circuitos identificados foi realizada através do cálculo do grau de independência, definido como percentual de bovinos e bubalinos movimentados dentro do período avaliado, ou seja, o número de animais movimentados que teve como origem e destino o mesmo circuito pecuário. Quanto maior este valor, maior a independência quanto à comercialização animal entre propriedades rurais de um determinado circuito em relação aos demais, no período avaliado. O resultado final da delimitação dos circuitos foi validado em reuniões com representantes dos serviços veterinários dos estados envolvidos.

Fatores de risco considerados

Uma vez delimitadas as subpopulações amostrais, o desafio seguinte foi definir a estratégia de avaliação de transmissão viral em cada um destes circuitos pecuários. Buscando aumentar a sensibilidade do estudo, optou-se por restringir a população de estudo a animais, rebanhos e localidades de maior risco de infecção, ou seja, de maior probabilidade para detecção do agente viral caso estivesse presente na região.

Como animais de maior risco, foram considerados os bovinos e bubalinos de 6 a 12 meses de idade, pois em populações submetidas à vacinação massiva e sistemática, os animais jovens não vacinados ou com reduzido histórico de vacinação são os de maior suscetibilidade. A faixa etária de 6 a 12 meses, permite reduzir, de um lado, a possível interferência de imunidade materna e, de outro, a possível interferência de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) em animais multivacinados. O referido grupo etário também inclui categoria animal de maior risco epidemiológico devido à condição de movimentação entre propriedades rurais, por razões de comércio (CAETANO JÚNIOR, 2000), e atende à certificação solicitada pela OIE de ausência de indícios de transmissão viral nos últimos 12 meses, em zonas livres com vacinação (Artigo 8.8.3, item 2b, Código Terrestre, versão 2017).

Os rebanhos de maior risco foram considerados aqueles com maior concentração de bovinos jovens, identificados a partir dos seguintes indicadores: razão entre bovinos ou bubalinos até 12 meses e fêmeas acima de 36 meses, $\geq 70\%$; ou participação de bovinos ou bubalinos até 24 meses em relação ao total no rebanho, $\geq 25\%$. Na realidade nacional, estes indicadores apontam, de forma indireta, para propriedades rurais com maior ingresso e comercialização de bovinos jovens, implicando, portanto, em maior risco de introdução ou disseminação do agente viral. Para análise dos indicadores e seleção das propriedades rurais, foram utilizados os bancos de dados de cadastro de propriedades rurais sob controle dos serviços veterinários oficiais em cada estado envolvido no estudo. Os bancos de dados foram extraídos no início de 2014, contemplando informações sobre o quantitativo dos rebanhos bovinos e bubalinos, por faixa etária e sexo.

As localidades de maior risco foram definidas como municípios de maior intensidade de movimentação animal, de acordo com os seguintes indicadores, calculados por município: número de diferentes origens (municípios) de ingresso no município; percentual de ingresso de bovinos e bubalinos no município em relação ao total de ingressos da subpopulação; percentual do movimento interno de bovinos e bubalinos no município; e percentual de bovinos movimentados no município em relação ao total de bovinos da subpopulação. Cada município foi classificado, por subpopulação amostral e de forma independente para os indicadores utilizados, na escala de 0 a 3 segundo o sistema de classificação por *quantis*, utilizando quatro classes (a menor recebendo escore 0, as intermediárias escores 1 e 2, e a maior, escore 3). Foram selecionados os municípios com somatório dos indicadores utilizados ≥ 3 .

Em síntese, a população de estudo, considerada como de maior probabilidade para detecção do agente viral, ficou constituída por bovinos ou bubalinos de 6 a 12 meses de idade, oriundos de propriedades rurais com maior concentração desse grupo etário e maior tendência à comercialização de bovinos e bubalinos, localizadas em municípios com maior intensidade de movimentação destas espécies.

Estratégia para avaliação de transmissão viral

Para investigação de transmissão do vírus da FA, foram conduzidos estudos de detecção em duas etapas (CAMERON e BALDOCK, 1998; FAO, 2014; OIE, 2014), com implantação de atividades longitudinais de avaliação clínica e de coleta de amostras de soro sanguíneo para identificação de anticorpos contra PNEs do vírus da FA. A investigação foi realizada de forma independente para cada subpopulação amostral, considerando as seguintes hipóteses epidemiológicas: i) caso exista transmissão viral em pelo menos 1% das propriedades rurais com bovinos ou bubalinos jovens, localizadas em municípios de maior intensidade de

movimentação animal, espera-se, com 95% de confiança, detectar pelo menos uma propriedade positiva; e ii) se em cada propriedade com transmissão viral existirem, pelo menos, 10% de bovinos ou bubalinos jovens infectados, a probabilidade de encontrar pelo menos um animal jovem positivo em cada uma delas é de 95%.

O total de rebanhos (entendidos como unidades primárias de amostragem - UPAs) para investigação em cada subpopulação foi definido utilizando-se o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, disponibilizado pelo *Animal Health Services – AusVet* (MARTIN et al., 1992; EPITOOLS, 2014; SERGEANT, 2015). Cada UPA representou um *cluster* definido como rebanho, ou agrupamento de rebanhos com proximidade física, constituído por animais com probabilidade semelhante de terem contato com o vírus da FA caso exista algum animal infectado dentro do grupo (ZILLER et al., 2002). Conforme a hipótese epidemiológica apresentada, os parâmetros utilizados para cálculo do número de UPAs, em cada subpopulação amostral, foram: prevalência mínima esperada de rebanhos infectados de 1% e sensibilidade e nível de confiança de 95%. A especificidade utilizada foi de 100%, considerando que cada UPA com pelo menos um animal com sinais clínicos compatíveis com doença vesicular ou resultado soropositivo ou indeterminado foi submetida a investigações complementares de forma a descartar ou confirmar a presença de infecção. Segundo os parâmetros utilizados, para cada subpopulação amostral foi definido o total de 330 UPAs, já acrescidos em 4,5% para compensar eventuais perdas durante o processo amostral. A alocação das UPAs por município de alta movimentação, ocorreu de forma proporcional ao total existente de bovinos e bubalinos no município em relação ao total da subpopulação envolvida, forçando-se a seleção de pelo menos uma UPA em cada município de alta movimentação. Nos municípios escolhidos, as propriedades rurais foram selecionadas, de forma aleatória, a partir da relação de propriedades definidas com base nos critérios apresentados anteriormente. A partir da lista de propriedades selecionadas para o estudo, os serviços veterinários oficiais realizaram as visitas de campo para constituir as UPAs e dar início às atividades de vigilância dirigidas à detecção de transmissão viral.

As propriedades selecionadas para o estudo passaram a ser monitoradas pelo serviço veterinário oficial, com previsão de inspeções a cada 15 dias. Todas as atividades foram registradas em formulários específicos, contemplando informações sobre a localização geográfica da propriedade rural, quantitativo dos rebanhos susceptíveis existentes, total de animais susceptíveis nascidos e mortos entre as inspeções e resultados dos exames clínicos realizados, entre outros dados. Todos os dados e informações foram inseridas em sistema informatizado disponibilizado pelo MAPA.

Em cada UPA foram selecionados, de forma aleatória, bovinos de 6 a 12 meses para avaliação clínica (com exame de boca e patas) e para coleta de amostras de soro sanguíneo visando a detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA. Os animais selecionados receberam identificação individual de longa duração e permaneceram sem vacinação contra a FA até o final da investigação. De forma a evitar as limitações para avaliação de transmissão viral em pequenos rebanhos, destacadas por Paton et al. (2004), e garantir uma sensibilidade de rebanho em cada UPA de, pelo menos, 95%, conforme discutido por Greiner e Dekker (2005), foi estabelecido um número mínimo de 20 bovinos de 6 a 12 meses por UPA. Dessa forma, quando na inspeção das propriedades selecionadas fossem identificados rebanhos com menos de 20 bovinos de 6 a 12 meses de idade, outras propriedades localizadas na vizinhança eram incluídas na UPA, até esta completar o número mínimo estabelecido de bovinos jovens. Diante deste procedimento, uma UPA pode estar constituída por uma ou mais propriedades.

Para avaliação de anticorpos contra PNEs do vírus da FA foram utilizados dois testes em série. Como teste de triagem foi utilizado o ELISA 3ABC, PrioCHECK®, com valores de sensibilidade e especificidade de 92,5% (IC95%: 86,3 – 97,4) e 97,8% (IC95%: 95,9 – 99,2), respectivamente, segundo Goris et al. (2007). Para confirmação, foi utilizada a prova *Western Blot de Imunoeletrotransferência* – EITB, do PANAFTOSA, que apresenta sensibilidade próxima a 100% e especificidade de 99%, em bovinos menores de 24 meses de idade e em rebanhos vacinados (PANAFTOSA, 2012a, 2012b).

Para definição do número de animais para amostragem e investigação em cada UPA, também foi utilizado o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, com as seguintes configurações: distribuição hipergeométrica; nível de confiança de 95%; sensibilidade agregada do sistema de diagnóstico de 91%; especificidade de 100%; e prevalência mínima esperada, intrarrebanho, de 10% em bovinos jovens.

A prevalência intrarrebanho utilizada, mostra-se bastante conservadora quando comparada com o percentual de casos clínicos registrados nas reintroduções da FA ocorridas no Brasil em 2000 e 2005/2006 (BRASIL, 2002; BRASIL, 2008), onde a prevalência nos focos índices foi de 32% e 26%, respectivamente. Também está fundamentada no percentual médio de bovinos jovens soropositivos identificado em sorologia conduzida na zona interdita implantada no entorno dos focos registrados em Mato Grosso do Sul e no Paraná, em 2005/2006 (BRASIL, 2008). Essa sorologia foi realizada seis meses após o último caso e após o despovoamento de todos os focos, sendo observada prevalência média de bovinos jovens soropositivos de 16,2% (IC 95%: 12,4% a 19,9%) em propriedades com menos de 500 bovinos, e de 10,3% (IC 95%: 5,5% a 15,1%) em propriedades com 500 ou mais bovinos.

Em complemento, a prevalência intrarrebanho utilizada também se mostra adequada ao percentual médio de bovinos com sinais clínicos observados nos focos registrados nos últimos anos nos países da América do Sul que empregam campanhas de vacinação massiva e sistemática contra a FA. Segundo os Informes de Situação dos Programas de Erradicação da Febre Aftosa, publicados anualmente pelo PANAFTOSA, para o período de 2000 a 2012, o percentual médio de bovinos com sinais clínicos nos focos ocorridos em países com vacinação foi de 10,4% ($\sigma = 8\%$). Deve-se ter claro, entretanto, que, em investigações sorológicas, esperam-se percentuais mais altos de animais soropositivos, como demonstrado por Gonzales et al. (2014) durante investigação conduzida em foco registrado na Bolívia, em 2007, envolvendo unidade epidemiológica constituída por 23 rebanhos, localizada em região onde a vacinação contra a FA era realizada duas vezes ao ano. A análise das informações suplementares disponibilizadas pelos autores, revela prevalência de casos clínicos nos 23 rebanhos variando de 0% a 64% (tamanho dos rebanhos variando entre 9 e 96 bovinos), enquanto os resultados ao teste ELISA 3ABC aplicado em amostras coletadas de todos os bovinos, revelaram percentuais de soropositivos variando de 5% a 89% ($\mu = 43,8\%$, $\sigma = 25,3\%$).

As amostras de soro sanguíneo foram enviadas para processamento pela rede de laboratórios do MAPA, associadas às seguintes informações para cada animal amostrado: identificação única; idade, em meses; sexo; número de vacinações aplicadas no animal durante sua permanência na propriedade; origem do animal, se nascido ou não na propriedade; e resultado das inspeções clínicas de boca e patas.

Após os resultados da primeira coleta, nas UPAs onde todos testes laboratoriais foram negativos e não foram encontrados sinais clínicos compatíveis com doença vesicular, as propriedades rurais foram liberadas após inspeção final pelo serviço veterinário oficial (cada propriedade teve a expectativa de, pelo menos, três inspeções: uma inspeção inicial, uma inspeção para coleta de amostras e uma inspeção final para liberação da propriedade). Em todas as inspeções foram realizados exames clínicos de boca e de patas nos animais amostrados.

As UPAs, com pelo menos um resultado soropositivo ou indeterminado, foram classificadas como possivelmente infectadas, dando origem à investigação epidemiológica complementar. As propriedades integrantes dessas UPAs permaneceram no estudo para realização de coleta pareada e novos exames clínicos. A coleta pareada constitui uma das estratégias previstas no Código Sanitário para os Animais Terrestres da OIE – Código Terrestre, para seguimento dos resultados soropositivos, representando a coleta de amostras de soro sanguíneo nos mesmos animais amostrados na coleta imediatamente anterior.

Com base nos resultados da coleta pareada e dos exames clínicos complementares, as propriedades pertencentes a UPAs sem permanência de animais soropositivos ou indeterminados e sem evidências clínicas de doença vesicular foram liberadas após inspeção final pelo serviço veterinário oficial. Nas UPAs com permanência de pelo menos um animal soropositivo ou indeterminado após a coleta pareada, as atividades de investigação complementar foram mantidas, incluindo novos exames clínicos e avaliação epidemiológica. Em todos os bovinos que permaneceram ao final do estudo com resultados indeterminados ou soropositivos foi prevista a realização de três coletas de amostras de líquido esofágico-faríngeo (LEF), em intervalo de 15 dias, para pesquisa viral por meio de teste de reação em cadeia da polimerase de transcrição inversa, em tempo real - RT-PCR (OIE, 2016b).

Análise da distribuição espacial dos rebanhos investigados

A presença de uma infecção em um país ou zona normalmente ocorre de forma aglomerada, não se esperando uma distribuição uniforme ou aleatória na população (OIE, 2016a). Assim, conforme recomendação do Código Terrestre da OIE, em seu Capítulo 1.4, versão 2016, esta tendência de concentração, ou formação de *clusters*, deve ser considerada tanto na organização das atividades de vigilância como na análise estatística e epidemiológica dos dados de vigilância. De forma simplificada, *cluster* espacial pode ser compreendido como qualquer agregado de eventos que não seja meramente casual (BRASIL, 2007).

Para verificar a viabilidade epidemiológica da formação de *clusters* de UPAs em cada subpopulação amostral, foi avaliada a distância linear entre as UPAs, identificando-se, para cada uma, a distância para o vizinho mais próximo. Para as UPAs constituídas por mais de uma propriedade, as análises consideraram o centroide do polígono gerado a partir das coordenadas geográficas de cada propriedade. Foi utilizado sistema global de coordenadas planas, com *datum* SIRGAS2000.

A análise espacial visando a identificação de *clusters* foi conduzida utilizando-se a associação de dois métodos complementares, um do tipo global e outro do tipo focal ou local, este último também mencionado como de detecção de aglomerados (BRASIL, 2007; DOHOO, 2010). Os testes do tipo global, avaliam a presença de *clusters* sem, contudo, identificar sua localização, ou seja, testa a hipótese de que não existe aglomerado na região contra a hipótese alternativa de que existe aglomerado, não especificando sua localização. Os testes de detecção de aglomerados, por sua vez, possibilitam identificar o local de ocorrência de *clusters* e testar sua significância estatística. Para as análises, cada UPA foi classificada como positiva (caso) ou negativa (controle), com base na presença de animais soropositivos ou indeterminados após a primeira coleta. Foram considerados dois cenários: um interpretando os resultados indeterminados como negativos e outro, como positivos.

Como teste global, foi utilizada a *Função-K de Ripley* (RIPLEY, 1977), conforme descrito por Negreiros et al. (2009) em trabalho que analisou a aglomeração espacial dos focos de FA registrados no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de outubro a dezembro de 2005. A *Função-K* é definida como o número esperado de pontos mais distantes a partir de uma distância “s” de um ponto arbitrário, dividido pela intensidade total dos pontos. As estimativas da *Função-K* foram calculadas para os casos ($K_{\text{caso}}(s)$) e para os controles ($K_{\text{controle}}(s)$), estimando-se a função $D(s)$, definida como $D(s) = (K_{\text{caso}}(s)) - (K_{\text{controle}}(s))$. A função $D(s)$ e o envelope (limites inferior e superior do comportamento aleatório com nível de confiança aproximado de 95%), foram calculados utilizando-se a biblioteca *Splancs* (ROWLINGSON e DIGGLE, 1993) com os softwares *R versão 3.3.1* (2016-06-21) e *Rstudio - Versão 0.99.902*.

Para o teste de detecção de aglomerados, foi realizada investigação por meio de estatística de varredura espacial (*Spatial Scan Statistic*), com o *software SATScan v9.4.2 64-bit*, utilizando-se a seguinte configuração: análise puramente espacial; modelo de probabilidade discreta de *Bernoulli* (casos e controles); varredura para áreas com altas taxas (*clusters* positivos); nível de significância de 5%; e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km (CUZICK e EDWARDS, 1990; KULLDORFF, 1997).

Estimativa dos custos diretos para realização dos estudos

Para cálculo das estimativas dos custos diretos do estudo, os itens de despesa relativos às principais atividades foram agrupados em três categorias: delineamento e preparação; atividades de campo; e testes laboratoriais. Na categoria de delineamento e preparação foram computadas despesas relacionadas com a realização de reuniões técnicas entre os coordenadores nacionais e estaduais para definição das bases metodológicas do estudo e padronização das atividades de campo a serem executadas em cada UF. Entre as despesas relacionadas com as atividades de campo, foram levantadas informações sobre a quantidade e valor dos materiais básicos utilizados para identificação dos animais amostrados e para realização das atividades de coleta, armazenamento, transporte e remessa das amostras; bem como sobre o total estimado de combustível gasto nas atividades de deslocamento às propriedades rurais para execução das atividades de vigilância. Quanto aos testes laboratoriais, foram considerados apenas os valores dos kits de diagnóstico utilizados. A estimativa final de custo foi realizada por estado, ajustada ao valor médio da taxa de câmbio oficial do Dólar americano, obtido em junho de 2014, início das atividades de campo (1 dólar americano = R\$ 2,32).

Resultados

Identificação das subpopulações amostrais

A identificação dos circuitos pecuários, com base na análise do trânsito de bovinos e bubalinos entre propriedades rurais, referente aos anos de 2012 e 2013, permitiu o agrupamento da zona livre de FA com vacinação em cinco subpopulações amostrais, conforme Figura 2. A Subpopulação 1, apresentou um grau de independência de 97%, sendo constituída pelos estados do Acre e Rondônia, e parte dos estados do Amazonas, Mato Grosso e Pará. Na Subpopulação 2, representada pelo Distrito Federal, estados de Goiás e Tocantins e parte dos estados da Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará e São Paulo, o nível de independência foi de 95%. A Subpopulação 3, apresentou o menor grau de independência, 90%, sendo formada pelos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Sergipe, mais parte dos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Os estados do Paraná e parte de Mato Grosso do Sul e de São Paulo, constituíram a Subpopulação 4, com nível de independência de 93%. Por fim, o estado do Rio Grande do Sul, separado geograficamente da restante da zona livre de FA com vacinação pelo estado de Santa Catarina (zona livre sem vacinação), constituiu a Subpopulação 5, com nível de independência de 99%. Informações sobre total de municípios, área geográfica e rebanho bovino e bubalino existente ao início de 2014, agrupadas por subpopulação amostral, estão disponíveis na Tabela 1.

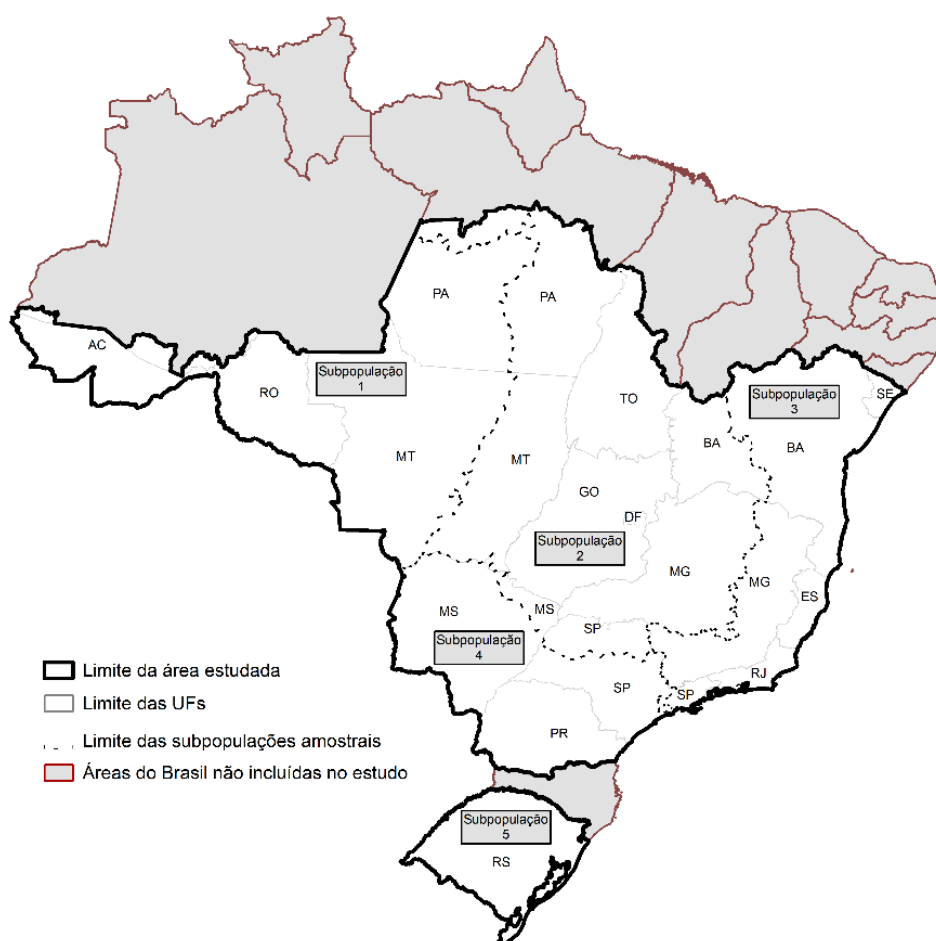


Figura 02. Representação geográfica das subpopulações amostrais

Tabela 01. Informações sobre a área geográfica e rebanho bovino existente na zona livre de febre aftosa com vacinação, no início de 2014, segundo as subpopulações amostrais consideradas no estudo

Subpopulação	Municípios		Área (km ²)		Propriedades com bovinos ou bubalinos		Bovinos e bubalinos		Bov/prop*
1	171	4%	1.340.200	26%	178.663	9%	35.084.600	19%	196
2	1041	27%	1.911.537	37%	546.672	29%	73.267.071	40%	134
3	1241	33%	788.843	15%	528.381	28%	25.035.455	14%	47
4	852	22%	830.912	16%	289.636	15%	34.399.294	19%	119
5	496	13%	268.648	5%	343.570	18%	13.344.523	7%	39
Total	3801	100%	5.140.140	100%	1.886.922	100%	181.130.943	100%	96

* Bov/prop. = Relação de Bovinos e bubalinos por propriedade rural

Descrição da amostra obtida

Informações gerais sobre a amostragem realizada e sobre o período de realização das fases iniciais de constituição das UPAs e de realização da primeira coleta estão resumidas na Tabela 2. Em complemento, o percentual mensal de propriedades com primeira coleta é apresentado na Figura 3, e a distribuição geográfica dos municípios de alta movimentação selecionados para o trabalho, classificados segundo o total de UPAs por município, está demonstrada na Figura 4.

Quanto ao total de UPAs, a quantidade estabelecida foi atendida em todas as subpopulações amostrais, destacando-se que na Subpopulação 2, o número previsto foi acrescido de 55 UPAs, especificamente no Distrito Federal, com objetivo de atender solicitação de mercado importador.

Do total de propriedades selecionadas, 89,3% (1.522/1.705) permaneceram no estudo e 10,7% (183/1.705) foram substituídas por não apresentarem, durante a inspeção inicial, bovinos ou bubalinos na faixa etária de 6 a 12 meses.

Com objetivo de complementar o número mínimo de bovinos jovens por UPA, foram incluídas mais 132 propriedades rurais no estudo, sendo 7 na Subpopulação 1, 41 na Subpopulação 2; 4 na Subpopulação 3; 18 na Subpopulação 4 e 62 na Subpopulação 5. Dessa forma, as 1.705 UPAs ficaram constituídas por 1.837 propriedades, sendo que 1.612 UPAs (94,6% do total) com uma propriedade; 62 (3,6% do total) com duas propriedades; e 31 (1,8% do total) com três ou mais propriedades. De forma geral, 82% das propriedades dedicavam-se à produção de carne, 11% à produção de leite; e 7%, à produção mista (carne e leite).

Em 99,4% das UPAs foi atendida a condição de existência de, no mínimo, 20 bovinos menores de 12 meses de idade. Apenas na Subpopulação 3, em 10 UPAs o número mínimo de animais não foi atendido (nove UPAs na Bahia e uma UPA em Sergipe).

Informações mais detalhadas sobre o total de bovinos amostrados por subpopulação estão disponíveis na Tabela 3. De forma geral para todas as subpopulações amostrais, 18,7% dos animais inspecionados e amostrados foram adquiridos pelos produtores rurais e, portanto, apresentavam histórico de pelo menos uma vacinação contra a FA (condição mínima para o comércio de bovinos e bubalinos). Entre os animais nascidos nas propriedades, segundo a declaração dos responsáveis pelos animais, apenas 3% não apresentavam histórico de vacinação contra a FA, 47% apresentavam histórico de uma vacinação e 50%, de duas vacinações. A distribuição dos animais amostrados nascidos nas propriedades, segundo histórico de vacinação e subpopulação amostral, pode ser avaliada na Figura 5.

Tabela 02. Informações sobre os períodos de realização das atividades iniciais de constituição das UPAs e de primeira coleta, bem como sobre a amostragem realizada, por subpopulação amostral.

Sub população	Fase inicial do trabalho (constituição das UPAs e 1ª coleta)						Amostragem realizada							
	Inspeção inicial			Primeira coleta			Municípios			UPAs			Bovinos	
	Início	Término	Tempo ¹	Início	Término	Tempo ¹	Total	Selecionado	%	Total	Prop. ²	Prop/UPA ³	Total	Bov/UPA ³
1	13/6/14	23/10/14	4,4	16/7/14	23/10/14	3,3	171	101	59%	330	337	1,0	9.944	30
2	15/5/14	22/9/14	4,3	9/7/14	10/4/15	9,2	1.041	237	23%	385	426	1,1	10.739	28
3	12/6/14	21/11/14	5,4	23/7/14	2/12/14	4,4	1.241	250	20%	330	334	1,0	8.342	25
4	12/5/14	26/9/14	4,6	31/7/14	9/12/14	4,4	852	220	26%	330	348	1,1	9.646	29
5	5/7/14	6/10/14	3,1	6/8/14	24/10/14	2,6	496	135	27%	330	392	1,2	8.853	27
Total	12/5/14	21/11/14	6,4	9/7/14	10/4/15	9,2	3.801	943	25%	1.705	1.837	1,1	47.524	28

1. Tempo em meses; 2. Prop. = propriedade rural; 3. Valores médios por subpopulação amostral.

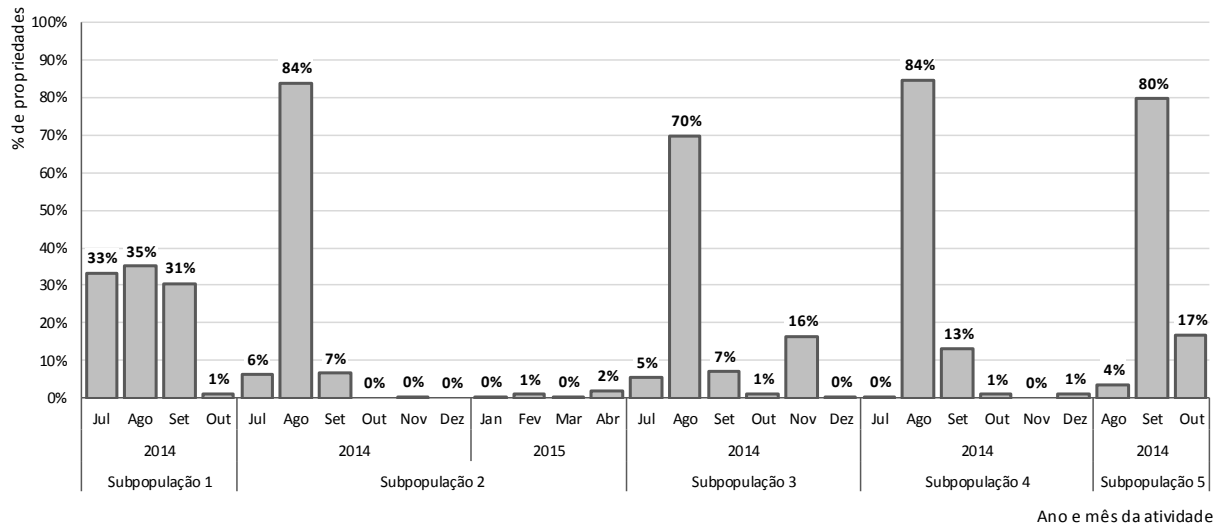


Figura 03. Percentual mensal de propriedades com realização da primeira coleta de amostras, por subpopulação amostral

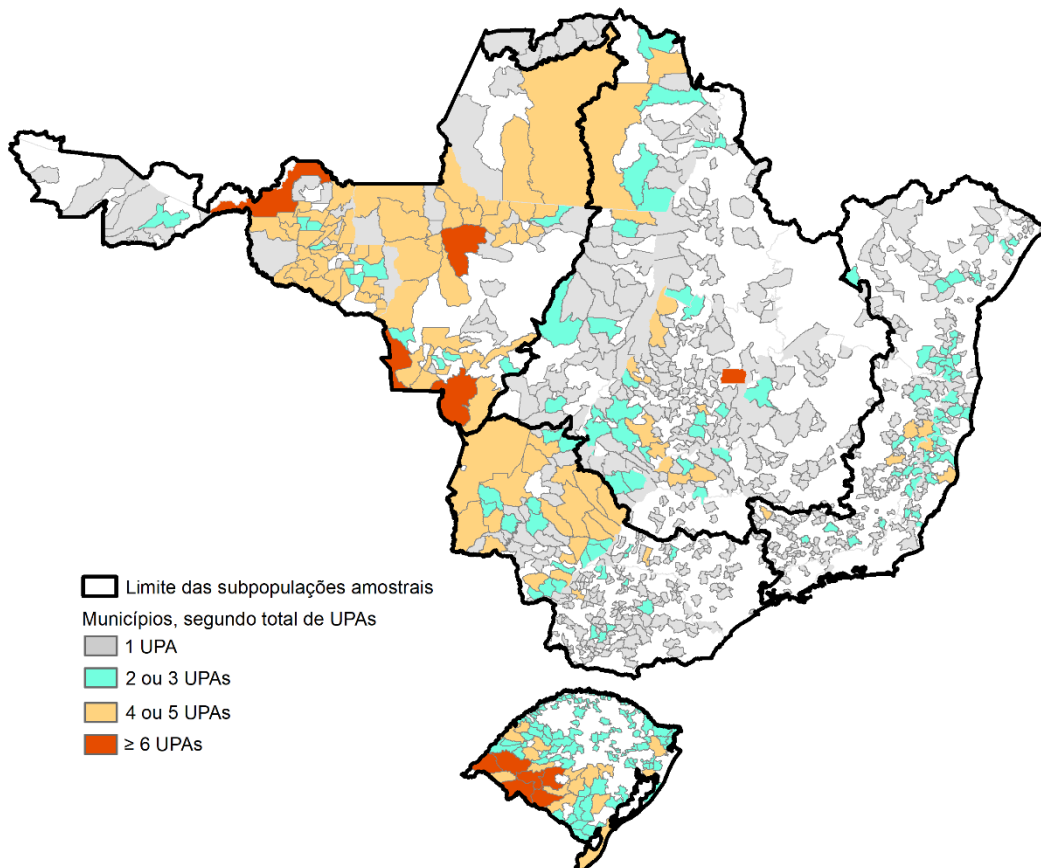
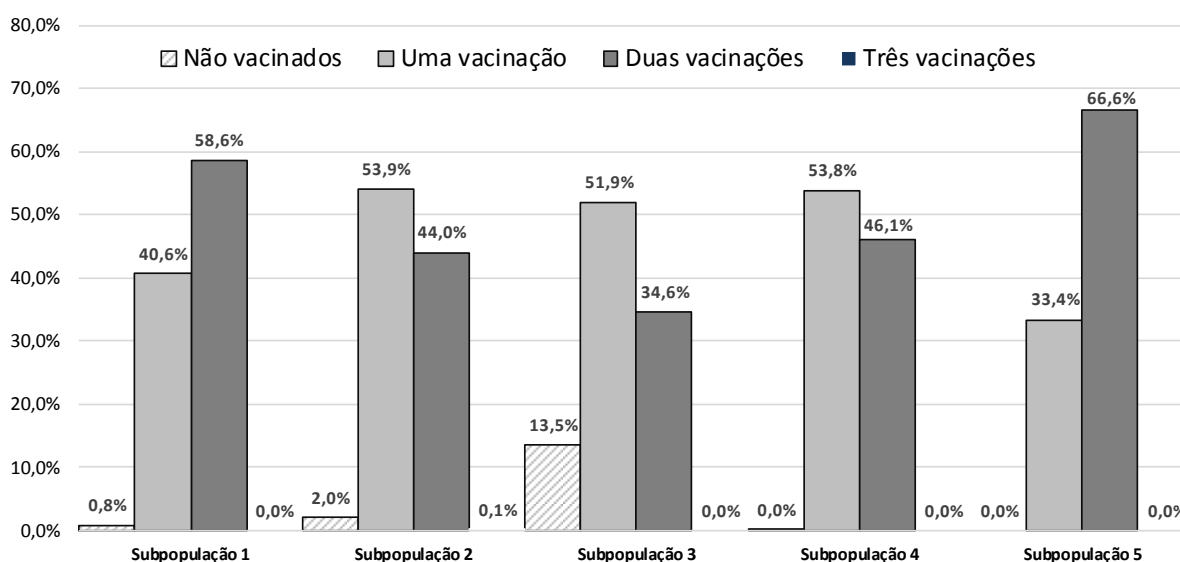


Figura 04. Distribuição dos municípios de alta movimentação, segundo o total de UPAs por município

Tabela 03. Total de bovinos amostrados por subpopulação amostral, segundo grupo etário e origem dos animais

Subpopulação	Bovinos amostrados	Grupo etário				Nascidos na propriedade			
		6 a 12 meses		> 12 meses		Sim		Não	
1	9.944	9.926	99,82%	18	0,18%	8.499	85,5%	1.445	14,5%
2	10.739	10.415	96,98%	324	3,02%	8.148	75,9%	2.591	24,1%
3	8.342	8.341	99,99%	1	0,01%	7.046	84,5%	1.296	15,5%
4	9.646	9.645	99,99%	1	0,01%	7.878	81,7%	1.768	18,3%
5	8.853	8.771	99,07%	82	0,93%	7.069	79,8%	1.784	20,2%
Total	47.524	47.098	99,10%	426	0,90%	38.640	81,3%	8.884	18,7%

**Figura 05.** Percentual de bovinos nascidos nas propriedades rurais, segundo histórico de vacinação, por subpopulação amostral

Atividades de vigilância clínica

No decorrer de todo o estudo e considerando o conjunto das subpopulações amostrais, foram realizadas 11.907 inspeções nas propriedades rurais selecionadas (incluindo inspeção inicial, inspeção para coletas de amostras e inspeções de seguimento). Na maioria das propriedades (92,3%) foram realizadas, no mínimo, três inspeções pelo serviço veterinário oficial. Em termos gerais, devido principalmente à dificuldade de acesso em algumas localidades e visando a otimização das atividades de inspeção, 13 propriedades (0,7% do total) apresentaram apenas uma inspeção (visita inicial e coleta no mesmo dia e liberação sem inspeção de encerramento após o resultado da primeira coleta) e 129 (7,0%), duas inspeções (sem inspeção de encerramento).

Durante as inspeções, foram realizados 258.090 exames clínicos de boca e de patas em bovinos, 13.717 em pequenos ruminantes e 9.173 em suínos. Foram identificados 6.999 animais com sinais clínicos indicativos de traumatismo ou lesões secundárias ou ulcerativas não compatíveis com doença vesicular, dos quais, 96% registrados em bovinos.

No período de estudo, foi registrado o nascimento de 465.016 bovinos, 7.549 pequenos ruminantes e 30.321 suínos nos rebanhos investigados. Quanto à mortalidade, foi registrada a perda de 10.771 bovinos, 384 pequenos ruminantes e 1.899 suínos, considerando todo o rebanho susceptível das propriedades monitoradas. Entre as possíveis causas de morte levantadas durante entrevistas com os responsáveis pelos animais, 27,5%, foi devido à idade avançada; 21,5%, a acidentes na propriedade ou traumatismos durante o manejo de animais; 17,4%, por desnutrição ou outros problemas nutricionais; 8,4%, a problemas infecciosos não relacionados a doenças vesiculares; 7,2%, relacionados a acidente ofídico; 7,0%, em consequência de ataque de animais; 4,5%, a problemas reprodutivos ou relacionados ao parto; 3,5%, a intoxicação por plantas e outros produtos químicos; e 3,0%, por verminose ou infestação parasitária.

Resultados dos testes laboratoriais para avaliação de anticorpos contra PNEs

Todo o estudo, considerando primeira coleta e coleta pareada, envolveu 58.591 amostras de soro sanguíneo, das quais, 2.464 amostras (4,2% do total) foram descartadas pela rede de laboratórios do MAPA, devido a problemas relacionados ao volume coletado (1.535 amostras); qualidade (174 amostras) e identificação (143 amostras).

Os resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta, estão sintetizados na Tabela 4, por subpopulação amostral. Do total de UPAs constituídas, em 1.400 (82% do total) não foram identificados animais soropositivos ou com resultados indeterminados e nem com sinais clínicos indicativos de doença vesicular, permitindo a liberação das propriedades rurais envolvidas, após inspeção final pelo serviço veterinário oficial.

Nas UPAs com pelo menos um bovino ou bubalino soropositivo ou indeterminado foram realizadas novas inspeções dos animais amostrados e realizada coleta pareada de amostras de soro sanguíneo, como parte das investigações complementares. Os resultados das coletas pareadas estão resumidos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente para as UPAs com pelo menos um animal indeterminado e para as UPAs com pelo menos um animal soropositivo na primeira coleta. Todas as UPAs mencionadas foram submetidas à coleta pareada, atingindo 95% do total previsto de amostras (8.347/8.787).

Nas UPAs classificadas como indeterminadas, dos 186 bovinos com resultado indeterminado ao sistema laboratorial utilizado na primeira coleta, apenas 11 animais (5,9%) localizados em nove UPAs, não foram incluídos na coleta pareada, devido a morte ou perda da identificação individual. Dos 175 bovinos indeterminados incluídos na coleta pareada, 164 (93,7%) apresentaram resultado negativo, 7 (4,0%) mantiveram resultado indeterminado e 4 (2,3%), localizados em quatro UPAs, tornaram-se soropositivos. Por outro lado, entre os bovinos negativos na primeira coleta, 20 passaram a apresentar resultado indeterminado e 21, resultado positivo.

Quanto às UPAs classificadas como positivas na primeira coleta, dos 31 animais com resultado indeterminado, 30 foram incluídos na coleta pareada, sendo que 29 tornaram-se negativos e apenas um manteve resultado indeterminado. Entre os 180 bovinos soropositivos, 170 foram recuperados para a coleta pareada, dos quais 158 (88% do total) tornaram-se negativos, cinco passaram a reagir como indeterminados e sete, localizados em sete UPAs, repetiram o resultado soropositivo. Entre os negativos na primeira coleta, 94% (3.891/4.127) foram incluídos na coleta pareada, dos quais 3.851 (98,97%) mantiveram o resultado negativo, 21 (0,54%) foram soropositivos e 19 (0,49%) indeterminados.

Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta

Subpopulação	UPA	Bovinos amostrados	Resultados					
			UPAs		Bovinos			
			Indeterminadas ¹	Positivas ²	Indeterminados ³		Positivos ³	
1	330	9.944	28	48	33	0,3%	62	0,6%
2	385	10.739	40	23	55	0,5%	26	0,2%
3	330	8.342	28	35	42	0,5%	44	0,5%
4	330	9.646	32	29	46	0,5%	32	0,3%
5	330	8.853	28	14	41	0,5%	16	0,2%
Total	1.705	47.524	156	149	217	0,5%	180	0,4%

1. UPA indeterminada = UPA com pelo menos um bovino com resultado indeterminado no sistema laboratorial utilizado

2. UPA positiva = UPA com pelo menos um bovino com resultado positivo no sistema laboratorial utilizado

3. Resultado frente ao sistema ELISA 3ABC PrioCHECK®/EITB

Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs sem bovinos soropositivos, mas com pelo menos um bovino indeterminado na primeira coleta.

Subpopulação	UPAs indeterminadas na primeira coleta					Coleta pareada							
	UPA	Bovinos				Realizado				Resultados			
		Amostrados		Ind		UPA		Amostras		UPAs		Bovinos	
		Amostrados	Ind	Ind/UPA	UPA	Amostras	Ind	Pos	Ind	Pos			
1	28	863	30	1,1	28	100%	856	99,2%	4	2	4	2	
2	40	1.174	48	1,2	40	100%	1.116	95,1%	1	5	4	6	
3	28	703	36	1,3	28	100%	669	95,2%	4	3	5	4	
4	32	955	38	1,2	32	100%	918	96,1%	3	9	8	10	
5	28	754	34	1,2	28	100%	697	92,4%	4	2	6	3	
Total	156	4.449	186	1,2	156	100%	4.256	95,7%	16	21	27	25	

Pos = positivo; Ind = indeterminado

Tabela 06. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino soropositivo na primeira coleta

Subpopulação	UPAs positivas na primeira coleta						Coleta pareada								
	UPA	Bovinos					Realizado				Resultados				
		Amostrados		Ind		Pos		UPA		Amostras		UPAs		Bovinos	
		Amostrados	Ind	Ind/UPA	Pos	Pos/UPA	UPA	Amostras	Ind	Pos	Ind	Pos			
1	48	1.469	3	0,1	62	1,3	48	100%	1.413	96,2%	4	10	7	11	
2	23	709	7	0,3	26	1,1	23	100%	653	92,1%	1	3	3	4	
3	35	902	6	0,2	44	1,3	35	100%	825	91,5%	7	3	11	3	
4	29	864	8	0,3	32	1,1	29	100%	819	94,8%	3	7	3	9	
5	14	394	7	0,5	16	1,1	14	100%	381	96,7%	1	1	1	1	
Total	149	4.338	31	0,2	180	1,2	149	100%	4.091	94,3%	16	24	25	28	

Pos = positivo; Ind = indeterminado

Em termos gerais, após a coleta pareada, das 305 UPAs investigadas, 228 tornaram-se negativas, 45 apresentaram pelo menos um bovino soropositivo e 32 pelo menos um bovino com resultado indeterminado. Dos 105 bovinos que apresentaram resultado soropositivo ou indeterminado na coleta pareada, 103 foram submetidos a três coletas de LEF (das 309 amostras previstas, apenas uma foi descartada no laboratório); um bovino com resultado indeterminado morreu e outro, também com resultado indeterminado, perdeu a identificação. Neste último caso, na UPA envolvida foi realizada nova coleta pareada de amostras de soro sanguíneo e todas apresentaram resultados negativos para detecção de anticorpos contra PNEs. Todas as 308 coletas de LEF, que tiveram as amostras processadas, foram realizadas em intervalo médio de 15 dias, obtendo resultados negativos para pesquisa viral, por meio de teste RT-PCR. Adicionalmente, dos 53 bovinos soropositivos na coleta pareada, em 43 foi realizada nova coleta de amostras de soro sanguíneo, das quais 40 apresentaram resultados negativos, um resultado indeterminado e duas, resultado positivo.

Análise espacial dos resultados obtidos na primeira coleta

A distribuição geográfica das UPAs, segundo classificação após a primeira coleta, pode ser avaliada na Figura 6. A distribuição das distâncias das UPAs em relação ao vizinho mais próximo está resumida na Figura 7, segundo a subpopulação amostral, com informações mais detalhadas para as UPAs classificadas como positivas ou indeterminadas apresentadas na Tabela 7.

Os resultados da análise espacial global, por meio da *Função-K*, para uma distância de até 100 km, estão apresentados na Figura 8, e os resultados obtidos com análise espacial local, de detecção de aglomerados, estão resumidos na Tabela 8. A análise espacial global apontou ausência de formação de *clusters* positivos em toda extensão geográfica das subpopulações amostrais, o que foi confirmado com a análise espacial local, considerando nível de significância de 5%.

Tabela 07. Classificação das UPAs de acordo com a distância linear para o vizinho mais próximo, por subpopulação amostral e segundo a classificação após os resultados dos testes sorológicos da primeira coleta

Distância (km)	Subpopulações (UPAs positivas ou indeterminadas)										Subpopulações (UPAs positivas)										
	1		2		3		4		5		1		2		3		4		5		
	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	UPA	% ¹	
< 5	5	7%	4	6%	0%	2	3%	6	14%	4	8%	2	9%	0%	0%	3	21%				
5 a < 15	30	46%	12	25%	21	33%	19	34%	22	67%	17	44%	3	22%	12	34%	14	48%	6	64%	
15 a < 25	20	72%	6	35%	22	68%	16	61%	7	83%	13	71%	2	30%	10	63%	7	72%	2	79%	
25 a < 35	6	80%	18	63%	12	87%	11	79%	4	93%	5	81%	7	61%	7	83%	5	90%	2	93%	
35 a < 50	9	92%	9	78%	8	100%	9	93%	3	100%	5	92%	3	74%	6	100%	2	97%	1	100%	
≥ a 50	6	100%	14	100%			4	100%			4	100%	6	100%	100%		1	100%			
Total	76		63		63		61		42		48		23		35		29		14		

1. Percentual acumulado por coluna

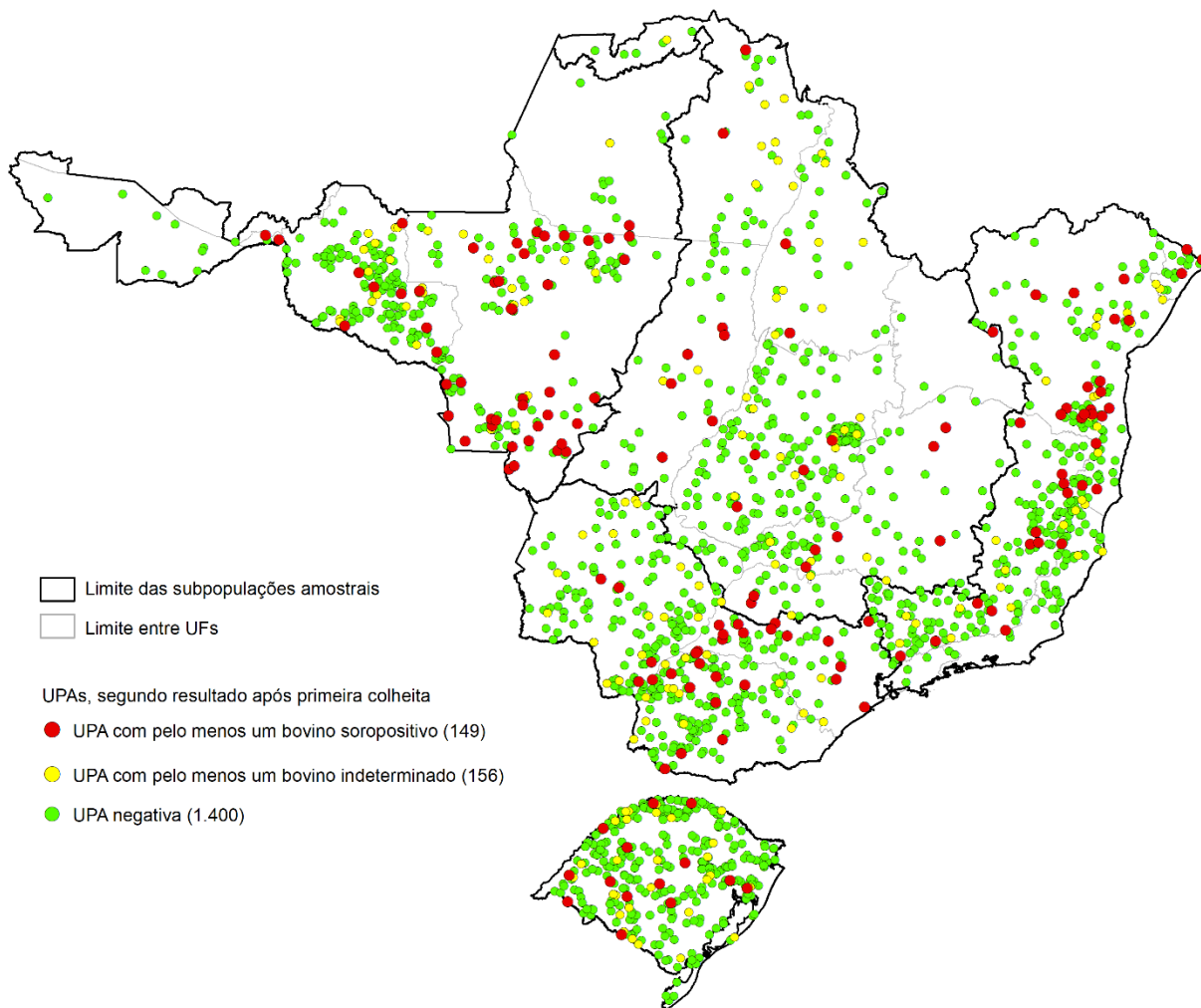


Figura 06. Distribuição geográfica das UPAs, segundo resultado sorológico após primeira coleta

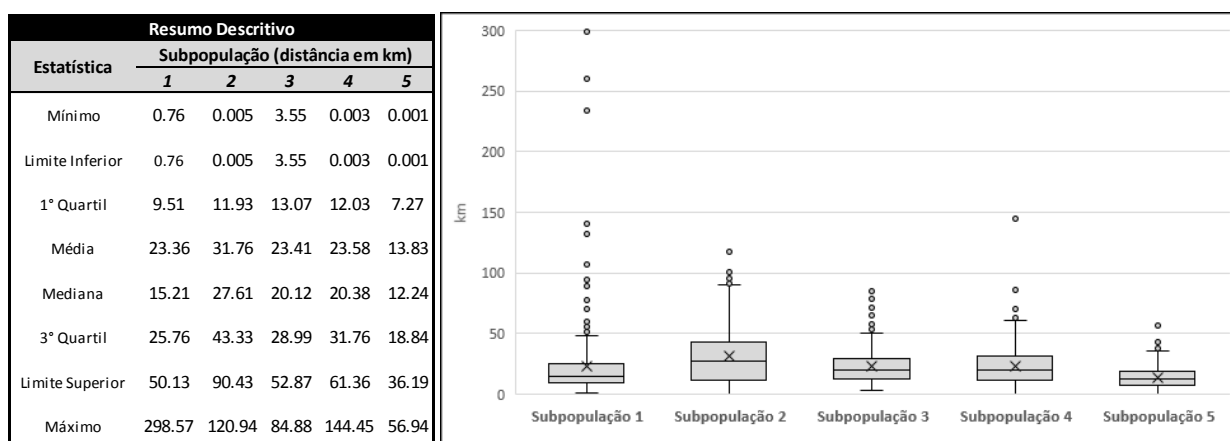


Figura 07. Representação da distribuição das distâncias lineares das UPAs em relação ao vizinho mais próximo, por subpopulação amostral

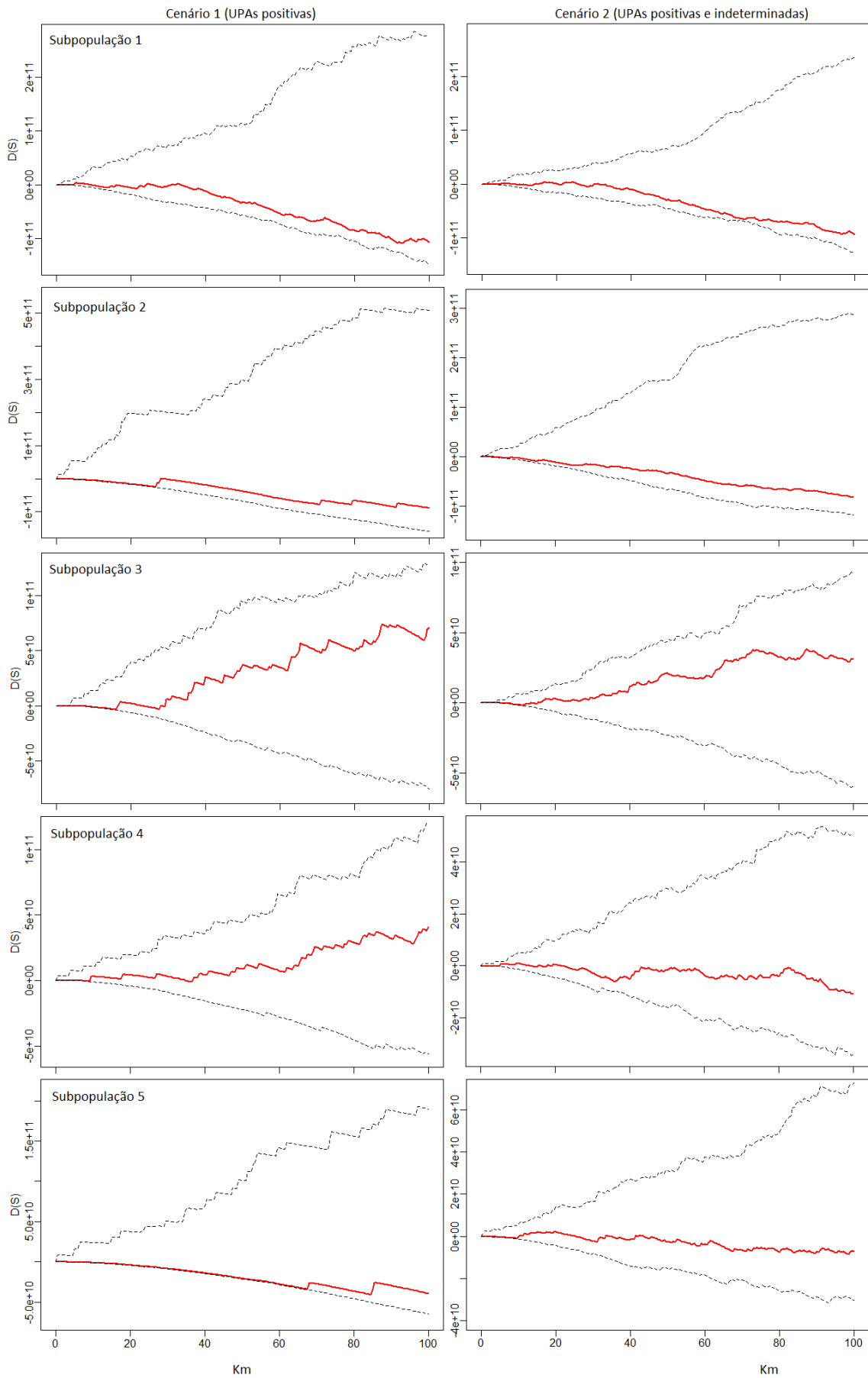


Figura 08. Representação gráfica do resultado da análise espacial para detecção de *clusters* por meio da *Função-K*. Linha sólida vermelha representa a estimativa da função $D(s)$ e as linhas pontilhadas o limite do envelope com 95% de confiança

Tabela 08. Resumo dos resultados da análise puramente espacial, com modelo *Bernoulli*, para *clusters* positivos, nível de significância de 5%, e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km.

Região	Cenário 1 (UPAs positivas)			Cenário 2 (UPAs positivas ou indeterminadas)		
	Cluster (ID das UPAs)	Raio (km)	p-valor	Cluster (ID das UPAs)	Raio (km)	p-valor
Subpopulação 1	MT134, MT133, MT136	31.25	0.130	MT134, MT133, MT136	31.25	0.410
	MT030, MT031	4.57	0.987	RO016, RO019, RO037	17.29	0.877
	MT033, MT036	20.97	0.987	MT079, MT081, MT078, MT080, MT147	27.80	0.959
	MT080, MT081	15.00	0.987			
	MT186, MT187, MT012, MT010, MT107, MT103	49.02	0.997			
Subpopulação 2	MT027, MT155	26.47	0.080	MG079, MG060	25.93	0.530
	SP003, SP067	26.21	0.537	MT027, MT155	26.47	0.990
	MG060, MG043, MG079, MG099, MG163	41.87	0.933	PA049, PA035, PA032, PA001	48.91	0.990
				MT039, MT128	30.04	0.990
				SP003, SP067	26.21	0.990
Subpopulação 3	BA011, BA048, BA082, BA083, BA004, BA050, BA063	36.18	0.309	BA044, BA043, BA056, BA063, BA054, BA058, BA060, BA083	43.42	0.207
	BA054, BA044	35.60	0.926	BA030, BA031, BA034	16.66	0.739
	BA112, BA113	29.69	0.926			
	MG004, MG065	33.99	0.926			
	BA040, BA041, BA065, BA031, BA005	35.09	0.938			
Subpopulação 4	MG098, MG203, MG202, MG062, MG083	37.58	0.938			
	SP051, SP058	25.00	0.338	MS114, MS113, MS112	34.52	0.190
	SP057, SP054	35.59	0.885			
	SP075, SP021	8.69	0.885			
	SP031, SP027, SP017	46.89	0.993			
Subpopulação 5				RS074, RS079	12.56	0.570
				RS103, RS100	10.85	0.990
	RS150, RS151, RS102, RS059, RS294, RS103, RS058	32.11	0.960	RS208, RS210	8.35	0.990
				RS216, RS217	28.9	0.990
				RS296, RS295	9.8	0.990
			RS315, RS006	15.19	0.990	

Estimativa dos custos gerais do estudo

Valores das principais despesas envolvidas na realização do estudo estão resumidos na Tabela 9, segundo UF participante. Na categoria “Planejamento e delineamento” foram consideradas despesas de deslocamento aéreo e diárias para realização, na unidade central do DSA em Brasília, DF, de duas reuniões técnicas com dois representantes dos serviços veterinários estaduais em cada reunião. A primeira reunião, com duração de um dia e meio, teve como objetivo principal a definição das bases metodológicas e estratégias de realização do estudo, e a segunda, com duração de dois dias, buscou discutir e padronizar a realização das atividades em cada UF, destacando o preenchimento dos formulários e do sistema eletrônico de controle do banco de dados do estudo.

Entre as atividades de campo, o consumo de combustível para deslocamento às propriedades foi estimado com base na distância linear entre o município de localização da unidade veterinária local e a sede das propriedades rurais, considerando um consumo médio de 7 km/l de combustível (gasolina). As despesas com materiais utilizados diretamente nas atividades

de identificação dos animais amostrados e de coleta, armazenamento e remessa das amostras foram disponibilizadas pelos serviços veterinários estaduais. Não foram considerados custos relacionados com salário dos profissionais envolvidos no trabalho, diárias para realização das atividades em cada UF, despesas com capacitação e treinamento interno dos profissionais, bem como depreciação dos equipamentos utilizados, entre outros custos indiretos envolvidos.

De forma geral, a categoria “Planejamento e delineamento” representou 4,76% dos custos totais; a categoria “Atividades de campo”, 55,88%; e os testes laboratoriais, 39,36%. O custo geral, apresentou um valor médio de US\$ 392.04/UPA ($SD = US\$ 162.42$), e de US\$14.28/animal amostrado ($SD = US\$ 5.64$).

Tabela 09. Custos gerais do estudo, em dólar americano, segundo categoria de despesa e UF.

UF	Planejamento e delineamento	Atividades de campo	Testes laboratoriais	Total
Acre	\$3,722.09	\$3,714.27	\$1,055.81	\$8,492.17
Bahia	\$1,880.33	\$13,482.95	\$14,729.19	\$30,092.47
Distrito Federal	\$0.00	\$13,152.11	\$4,906.86	\$18,058.97
Espírito Santo	\$1,363.43	\$8,679.77	\$4,945.62	\$14,988.81
Goiás	\$1,404.59	\$33,451.41	\$14,549.68	\$49,405.67
Minas Gerais	\$1,413.53	\$30,131.56	\$25,810.51	\$57,355.61
Mato Grosso do Sul	\$1,848.40	\$36,769.50	\$20,585.33	\$59,203.23
Mato Grosso	\$1,537.91	\$48,778.40	\$29,610.72	\$79,927.03
Pará	\$1,910.75	\$19,150.11	\$7,237.03	\$28,297.89
Paraná	\$1,483.04	\$20,041.57	\$16,843.98	\$38,368.58
Rio de Janeiro	\$1,273.66	\$1,276.82	\$501.32	\$3,051.80
Rondônia	\$2,101.63	\$24,529.12	\$20,584.55	\$47,215.29
Rio Grande do Sul	\$1,962.65	\$34,416.62	\$38,105.98	\$74,485.25
Sergipe	\$1,894.93	\$1,495.05	\$1,838.17	\$5,228.16
São Paulo	\$1,221.58	\$12,274.04	\$10,801.99	\$24,297.61
Tocantins	\$1,231.89	\$6,836.29	\$4,983.59	\$13,051.77
Total	\$26,250.39	\$308,179.58	\$217,090.33	\$551,520.31

Discussão

A realização de estudos epidemiológicos dessa dimensão geográfica e complexidade operacional é um grande desafio. O sucesso deste tipo de atividade exige adequada preparação e disponibilidade de recursos e estrutura, além de rígidos sistemas de acompanhamento e controle, tendo em vista as diferentes situações observadas a campo, especialmente em países onde a criação de bovinos ocorre, predominantemente, de forma extensiva e com diferentes níveis de estrutura e organização. Independente das dificuldades inerentes a esse tipo de trabalho, o estudo realizado atendeu satisfatoriamente as metas e os objetivos estabelecidos, discutindo-se na sequência alguns pontos de destaque.

Diante da disponibilidade de informações sobre a comercialização pecuária, como o registro da movimentação animal, a definição das subpopulações amostrais com base nos circuitos pecuários apresenta-se como excelente ferramenta metodológica para otimizar racionalmente a busca por transmissão viral, para doenças com a característica de alto poder de

difusão como o caso da FA, em áreas de grande dimensão geográfica. Esta abordagem minimiza os extremos de considerar o espaço geográfico como única população de estudo, o que limita a representatividade do trabalho, ou de considerar as divisões político-administrativas como espaços independentes, o que amplifica desnecessariamente o tamanho amostral e, conseqüentemente, os custos de execução. A definição da unidade geográfica mínima a ser considerada na identificação dos circuitos de comercialização pecuária, que neste trabalho foi representada pelos municípios organizados em microrregiões geográficas, é um importante item de configuração, que dependerá, além do objetivo em questão, da disponibilidade da informação, do volume e representatividade dos dados para análise e da capacidade computacional de processamento destes dados. Independente da definição adotada, no caso do sistema de produção de bovinos recomenda-se trabalhar com um histórico de, pelo menos, dois anos de movimentação animal.

Os indicadores utilizados para chegar aos elementos de risco considerados no trabalho mostraram-se adequados para a região estudada. A seleção dos municípios de alta movimentação proporcionou uma boa representação espacial, com algumas poucas áreas descobertas, onde predominam atividades agrícolas, sistemas de produção de outras espécies ou áreas de floresta. No caso das propriedades com maior tendência à comercialização de bovinos ou bubalinos, os indicadores possibilitaram a seleção de estabelecimentos rurais com predominância do sistema de produção de carne ou misto (89% das propriedades selecionadas), sabidamente os de maior vulnerabilidade (ASTUDILLO, 1984).

A previsão de animais amostrados por rebanho foi atendida de forma satisfatória. Em apenas 10 UPAs (0,6% do total), concentradas na Subpopulação 3, o número mínimo de 20 animais por UPA não foi atingido, valor dentro da margem de segurança empregada no cálculo do número de UPAs por subpopulação amostral. Entre os bovinos ou bubalinos selecionados para exame clínico e coleta de soro sanguíneo, a amostragem cumpriu adequadamente com o previsto, registrando-se apenas 426 animais com idade acima de 12 meses (0,9% do total). Estes animais concentraram-se especialmente na Subpopulação 2, no estado de Goiás (324 bovinos). Na realidade, os animais iniciaram o estudo dentro da faixa etária preconizada, entretanto, houve necessidade de substituição dos brincos de identificação, com a coleta de amostras realizada posteriormente nos mesmos animais, entretanto com idade acima de 12 meses. Em relação ao histórico de vacinações contra a FA, apenas um reduzido número de animais não apresentou registro de vacinação (3%). Por outro lado, um expressivo número de animais (47%) apresentava histórico de apenas uma vacinação, caracterizando um baixo nível de proteção humoral contra o agente viral induzido pela vacina e, dessa forma, com maior expectativa de infecção caso houvesse presença do vírus da FA na região.

Quanto à execução, o trabalho mesclou a realização de estudo do tipo transversal, representado pela fase de coleta de amostras para avaliação sorológica, com ações de vigilância longitudinal constituídas pelas inspeções às propriedades rurais para realização de exames clínicos de animais susceptíveis e para realização de coleta pareada visando a investigação dos resultados positivos ou indeterminados na primeira coleta. Apesar das investigações clínicas não serem consideradas no cálculo final de sensibilidade do estudo, sua realização e registro estimula a presença do serviço veterinário oficial em propriedades de maior risco e proporciona maior confiabilidade ao trabalho.

No que diz respeito à coleta de amostras, em termos gerais, o período de realização da primeira coleta, em média, ocorreu entre 2 e 3 meses em cada subpopulação amostral, conforme demonstrado na Figura 3, período considerado satisfatório para a fase transversal do estudo. A maior extensão desta atividade foi registrada na Subpopulação 2, devido principalmente a problemas de identificação dos animais no estado de Goiás, conforme relatado anteriormente.

Em relação à qualidade das amostras coletadas, destaca-se um descarte de 4,2% pela rede de laboratórios do MAPA, tendo como causa principal a quantidade insuficiente de material para processamento. Apesar deste descarte não ter comprometido a amostragem prevista, seu valor ficou bem acima do registrado em estudos anteriores, onde o percentual de descarte girou em torno de 1%, o que aponta para a necessidade de reforçar os treinamentos e os procedimentos de controle nos próximos estudos.

Os resultados dos testes laboratoriais para detecção de PNEs do vírus da FA, em todas as subpopulações amostrais, mostraram-se incompatíveis com transmissão viral, com os percentuais de soropositivos ficando próximos ao padrão de especificidade do método de diagnóstico laboratorial utilizado. Considerando apenas os resultados positivos após a primeira coleta, a especificidade neste estudo, de acordo com o conjunto das subpopulações amostrais, foi de 99,62% (IC95%: 99,56% a 99,67%). Incluindo os resultados indeterminados, sobre os quais não há informações de reatividade publicadas pelos fabricantes ou mesmo na literatura científica, a especificidade global observada foi de 99,16% (IC95%: 99,08% a 99,25%).

As atividades de investigação complementar contribuíram para descartar os casos positivos ou indeterminados como consequentes de transmissão viral. A recuperação de animais amostrados para a coleta pareada e para a realização de coleta de LEF para pesquisa viral foi bastante expressiva. Em todas as UPAs avaliadas não foi registrado aumento de animais soropositivos ou indeterminados, assim como quaisquer indícios clínicos de doença vesicular durante os vários exames clínicos de boca e patas conduzidos nos animais amostrados.

A análise espacial também reforçou a incompatibilidade dos resultados sorológicos com processo infeccioso. Entretanto, os resultados devem ser avaliados considerando as informações contidas na Tabela 7, e tendo como referência a expectativa de formação de *clusters* até uma distância de 25 km, conforme observado por Negreiros et al. (2009) durante análise dos focos de FA registrados no país em 2005. Dessa forma, mesmo na presença de transmissão viral, o potencial de formação de *clusters* na Subpopulação 2, em particular, é reduzido, uma vez que apenas 35% das UPAs com animais soropositivos ou indeterminados apresentaram vizinhos mais próximos a uma distância de até 25 km. Para as demais subpopulações, este percentual variou de 61% (Subpopulação 4) a 83% (Subpopulação 5), demonstrando melhor potencial de agrupamento de casos, diante de possível presença de transmissão viral.

Ainda em relação à análise espacial, entre os resultados apresentados pela análise de varredura circular (Tabela 8), chama atenção o agrupamento identificado na Subpopulação 2, formado pelas UPAs MT027 e MT155, a uma distância de 26,32 km. Apesar da ausência de significância estatística (p -valor = 0,08), é importante apresentar informações adicionais que ajudem a descartar o referido agrupamento como possível *cluster* epidemiológico para FA. Em cada uma das duas UPAs envolvidas, foram coletadas amostras de 32 bovinos nascidos nas propriedades, com idades entre 8 e 11 meses e com histórico de 1 a 2 duas vacinações contra a FA. Na primeira coleta foi identificado um bovino soropositivo na UPA MT027 e dois na UPA MT155. Para coleta pareada, foram recuperados 31 animais na UPA MT027, incluindo o bovino soropositivo na primeira coleta, que manteve o resultado positivo, e todos os animais na UPA MT155 que apresentaram resultado negativo. Na UPA MT027, continuaram as atividades de investigação complementar, sendo coletada nova amostra de soro sanguíneo e três amostras de LEF do bovino soropositivo. Todos os resultados foram negativos. A UPA MT027 foi submetida a 11 inspeções pelo serviço veterinário oficial e a UPA MT155, a 10 inspeções, não sendo registrados sinais clínicos compatíveis com doença vesicular.

Com apoio do aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, foram registrados os seguintes valores médios para sensibilidade de rebanho em cada subpopulação amostral: Subpopulação 1, 94.9% (SD = 1.2%); Subpopulação 2, 94.3% (SD = 2.9%); Subpopulação 3, 93.0% (SD = 5.6%); Subpopulação 4, 94.6% (SD = 2.5%); e Subpopulação 5, 95.1% (SD = 1.9%). Com base no mesmo aplicativo, os valores para sensibilidade deste componente do sistema de vigilância foram: 95.7% na Subpopulação 1; 97.4%, na Subpopulação 2; 95.4%, na Subpopulação 3; e 95.7%, nas Subpopulações 4 e 5.

Considerando os resultados obtidos, a probabilidade de cada subpopulação amostral estar livre de transmissão do vírus da FA, é de 99.5% para as Subpopulações 1, 3, 4 e 5; e de 99.7% para a Subpopulação 2. Essa probabilidade foi calculada com base na fórmula descrita pela FAO (2014): $P_{\text{livre}} = (1 - P)/(1-(P*Se))$; onde P = probabilidade a priori de que a região está infectada e Se = sensibilidade do componente do sistema de vigilância. As probabilidades de livre foram obtidas considerando um valor conservador de $P = 10\%$.

Em complemento à análise epidemiológica realizada, foram apresentadas, de forma simplificada, informações sobre os custos diretos com a realização do estudo, com objetivo de contribuir para avaliação econômica deste componente do sistema de vigilância entre as demais atividades conduzidas pelo serviço veterinário oficial. Verifica-se que entre as categorias de gastos utilizadas, as atividades de campo, responsáveis por 56% do custo total do estudo, são as que estão sujeitas à maior variabilidade, dependendo da estratégia de delineamento utilizado, das propriedades selecionadas, dos resultados obtidos após a primeira coleta e de características econômicas e administrativas de cada estado envolvido. Nesta categoria, as atividades de inspeção a campo (considerando apenas a estimativa com gasto de combustível para deslocamento às propriedades rurais) representaram 54% do custo, enquanto os gastos com materiais utilizados na coleta e na identificação dos animais representaram 42% e os gastos com remessa das amostras aos laboratórios, 4%.

Com respeito à estratégia a ser utilizada, uma decisão importante diz respeito ao tratamento a ser empregado aos resultados indeterminados nos testes para detecção de PNEs do vírus da FA, uma vez que, dependendo da conduta definida, poderá envolver maiores gastos com a realização de inspeções e testes laboratoriais. Neste estudo, os resultados indeterminados obtidos na primeira coleta foram tratados de forma semelhante aos resultados positivos, levando à implantação de ações de investigação complementar e de coleta pareada. Simulando os resultados indeterminados como negativos, observou-se uma redução de 6,4% nos gastos gerais, o que mostra um impacto financeiro reduzido em relação ao custo total do estudo, e indica que a decisão quanto ao tratamento dos resultados indeterminados deve, basicamente, limitar-se aos aspectos epidemiológicos envolvidos.

De forma geral, com base em uma comparação direta com o potencial de exportação de produtos pecuários do país, os custos diretos do estudo representaram 0,01% do valor obtido apenas com as exportações de carne bovina em 2014, que atingiu o montante de US\$ 5,8 bilhões (ALICEWEB, 2014).

Agradecimentos

Estudos epidemiológicos, como o descrito neste trabalho, somente são possíveis com a participação de número expressivo de profissionais, responsáveis por diferentes atividades de coordenação e execução. Dessa forma, o autor gostaria de reconhecer e agradecer a participação dos profissionais dos serviços veterinários oficiais localizados nos estados envolvidos no trabalho e dos profissionais da rede oficial de laboratórios do Ministério da Agricultura, responsáveis pela realização dos testes laboratoriais.

Referências

ALICEWEB, 2014. Secretaria de Comércio Exterior. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Sistema de Análise das Informações de Comércio exterior, <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>.

ASTUDILLO, V., DORA J. F. e SILVA A. J. M., 1986: Ecosistemas y estrategias regionales de control de la fiebre aftosa. Aplicación al caso de Rio Grande do Sul, Brasil / Ecosystems and regional strategies for foot-and-mouth disease control. Application to the case of Rio Grande do Sul, Brazil. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**; 52: 47-78. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Bol52-p63-77ingAstudillo.pdf>.

ASTUDILLO, V. M., 1984: Formas de organização da produção como determinantes de risco de febre aftosa. **A Hora Veterinária**, ano 3, n. 17, 11-20. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Astudillo-formas-producao-HoraVet-1984.pdf>

ASTUDILLO, V. M., 1983: Sistema de información y vigilancia de las enfermedades vesiculares en las Américas. Utilización de mapas de coordenadas para la observación, registro y comunicación de datos. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, vol. 2, n. 3, p. 725-738.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2008: **Application for restoration of recognition of FMD-free zone with vaccination status**. Report presented to the World Organisation for Animal Health - OIE, requesting the restitution of the recognition of the sanitary status of FMD-free zone with vaccination for the area constituted by the states of Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe and Tocantins. Brasília, DF, April, 49 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2007: **Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública** / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; Simone M. Santos, Wayner V. Souza, organizadores. - Brasília: Ministério da Saúde, 120 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) (Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde; 3)

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2006: **Instrução Normativa, n. 18, de 18 de julho de 2006**. Aprova o modelo da Guia de Trânsito Animal (GTA) a ser utilizado em todo o território nacional para o trânsito de animais vivos, ovos férteis e outros materiais de multiplicação animal. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2002: **Elimination of the outbreaks of the FMD occurred in the state of Rio Grande do Sul, Brazil**. Report to the FMD and other Epizooties Commission of the Animal World Health Organization – OIE – aiming the restitution of the sanitary condition of the FMD free zone with vaccination for the Sates of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Brasília, DF: October, 2002, 199 p.

CAETANO JUNIOR, J. (1996). **Avaliação de risco nos focos de febre aftosa em bovinos: Minas Gerais, 1992 a 1994.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária, UFMG. 68 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária).

CAMERON, A. R. e F. BALDOCK, C., 1998: Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine** 34, 19-30.

CAPORALE, V., GIOVANNINI, A. e ZEPEDA, C., 2012: Surveillance strategies for foot and mouth disease to prove absence of disease and absence of viral circulation. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 31(3), p. 747-759.

CUZICK, J. e EDWARDS, R., 1990: Spatial clustering for inhomogeneous populations. **J. Royal Statistical Society B** 52, p. 73-104.

DOHOO, I., MARTIN, W. e STRYHN, H., 2010: **Veterinary epidemiologic research.** National Library of Canada Cataloguing in Publication, 2 ed. ISBN 978-0-919013-60-5.

DORA, J. F. P. e PETRY, M. C., 1984: Importância epidemiológica das espécies animais em febre aftosa. **A Hora Veterinária.** Porto Alegre, v. 3, n. 17, p. 53-59.

EPITOOLS, 2014: Website (available at <http://epitools.ausvet.com.au/>)

ERIC M. F., E. M, BRONSVOORT, B. M. C, HAMILTON, K. A. e CLEAVELAND, S., 2006: Animal movements and the spread of infectious diseases. **TRENDS in Microbiology**, v.14, n. 3, March

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014: **Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease.** FAO Animal Production and Health Manual n. 17. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-108637-7. 199 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2011: **A value chain approach to animal diseases risk management – Technical foundations and practical framework for field application.** Animal Production and Health Guidelines n. 4. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-106861-8. 140 p.

GONZALES, J. L., BARRIENTOS, M. A., QUIROGA, J. L., ARDAYA, D, DAZA, O., MARTINEZ, C., OROZCO, C., CROWTHER, J., e PATON, D. J., 2014: Within herd transmission and evaluation of the performance of clinical and serological diagnosis of foot-and-mouth disease in partially immune cattle herds. **Vaccine**, 32, p. 6193–6198

GORIS, N., PRAET, N., SAMMIN, D., YADIN, H., PATON, D., BROCCHI, E., BERVENS, D. e DE CLERCQ, K., 2007: Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELISA tests and true prevalence in the field. **Vaccine**, 25, p. 7177-7196.

GREINER, M. e DEKKER A., 2005. On the surveillance for animal diseases in small herds. **Preventive Veterinary Medicine** 70, 223–234. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.03.007

GRISI-FILHO, J.H.H., AMAKU, M., FERREIRA, F., DIAS, R. A., FERREIRA NETO, J.S.F., NEGREIROS, R.L. e OSSADA, R., 2013: Detecting livestock production zones. **Preventive Veterinary Medicine** 110, 304–311. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.12.013

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2011: **Base de informações do Censo Demográfico 2010: Resultados do Universo por setor censitário**. Rio de Janeiro, 125 p.

KNIGHT-JONES, T. J. D., L. ROBINSON, L., CHARLESTON, B., RODRIGUEZ, GAY, C. G., SUMPTION, K. J. e VOSLOO, W., 2016: Global Foot-and-Mouth Disease Research Update e Gap Analysis: 1 - Overview of Global Status and Research Needs. **Transboundary and Emerging Diseases**. 63 (Suppl. 1) p. 3–13.

KULLDORFF, M., 1997: A spatial scan statistic. **Communications in Statistics, Theory and Methods** 26, p. 1481-1496.

LEMOS, M. B., DINIZ, C. C., GUERRA, L. P. e MORO, S., 2003: A Nova Configuração Regional Brasileira e sua Geografia Econômica. **Est. Econ.**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 665-700.

MARTIN, P. A. J., CAMERON, A. R. e GREINER, M., 2007: Demonstrating freedom from disease using multiple complex data source. 1: A new methodology based on scenario trees. **Preventive Veterinary Medicine**, 79, p. 98-115.

MARTIN, P. A. J., CAMERON, A. R. e GREINER, M., 2007: Demonstrating freedom from disease using multiple complex data source. 1: A new methodology based on scenario trees. **Preventive Veterinary Medicine**, 79, 98-115.

MARTIN, S. W., SHOUKRI, M. e THORBURN, M. A., 1992: Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, 14, 33-43. doi:10.1016/0167-5877(92)90082-Q

MENDES DA SILVA, A. J., BRASIL, E., SARAIVA, V., DARSIE, G. e NARANJO, J., 2011: **SIVCONT epidemiological information and surveillance system**. In: Challenges of animal health information systems and surveillance for animal diseases and zoonoses. Rome: FAO, 2011. p 57-62. (FAO Animal Production and Health Proceedings, n. 14).

NEGREIROS, R. L., AMAKU, M., DIAS, R. A., FERREIRA, F., CAVALLÉRO, J. C. M. e FERREIRO NETO, J. S., 2009: Spatial clustering analysis of the foot-and-mouth disease outbreaks in Mato Grosso do Sul state, Brazil – 2005. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p. 2609-2613.

OBIAGA, J.A.; ROSEMBERG, F.J.; ASTUDILLO, V.M. e GOIC R. M., 1979: Characteristics of livestock production as determinant of foot-and-mouth disease ecosystems. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, n. 33-34, p. 43-52.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016a: **List of FMD free Member Countries**. Acessado em dezembro de 2016, de www.oie.int.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016b: **Terrestrial Animal Health Code**. Acessado em dezembro de 2016, de www.oie.int.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016c: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus), Chapter 2.1.8. Paris, France, 31 p. (NB: Version adopted in May 2012).

OIE (World Organisation for Animal Health), 2014: **Guide to terrestrial animal health surveillance**. ISBN 978-92-9044-842-6. 108 pp.

OIE (World Organisation for Animal Health), 1992: **International Animal Health Code: mammals, birds and bees**. 6th Edition. Paris, France.

Olascoaga, R.C.; Gomes I.; Rosenberg, F.J.; Mello, P. A.; Astudillo. V. e Magallanes N., 1999: **Fiebre Aftosa**. São Paulo: Editora Atheneu, 458 p.

OLASCOAGA, R. C., 1982: Sistema de información y vigilancia epidemiológica de las enfermedades vesiculares en las Américas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, vol. 1, n. 1, p. 11-27.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2016: Informe de situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa. Sudamérica y Panamá, año de 2015. PANAFTOSA – OPS/OMS. 144 p.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2015: **Guía Técnica de Trabajo para la Última Etapa del Programa Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa - PHEFA**. PANAFTOSA – OPS/OMS. 50 p.

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012a: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa Prueba Confirmatoria, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012b: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa, Prueba Tamiz, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2011: **Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease – PHEFA, Action Plan 2011-2020**. Approved Document – 15-12-2010. 46 p. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/PHEFA-PlanAccion-2011-2020ing.pdf>

PATON, D.J., DE CLERCQ, K. e DEKKER, A., 2004. **Post-vaccinal Serosurveillance for FMD: A European Perspective on Progress and Problems**, <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App76.pdf>.

RIPLEY, B. D., 1977: Modelling spatial patterns (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, v.39, p.172-212.

ROWLINGSON, B. S. E, DIGGLE e P. J. SPLANCS, 1993: spatial point pattern analysis code in S-Plus. **Computers and Geosciences**, v.19, p.627-655.

SERGEANT, E. S. G., 2015: **Epitools epidemiological calculators**. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.

ZILLER, M., SELHORST, T., TEUFFERT, J., KRAMER, M. e SCHLÜTER, H., 2002: Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. **Preventive Veterinary Medicine**, 52, 333–343.

Capítulo 5

AValiação DE TRANSMISSÃO DO VíRUS DA FEBRE AFTOSA EM ESTADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA DO BRASIL, 2014/2015

Resumo

O artigo descreve o estudo de avaliação de transmissão do vírus da febre aftosa (FA) realizado em parte da Região Amazônica, nos anos de 2014 e 2015. O estudo foi conduzido nos estados do Amapá (AP) e de Roraima (RR), em parte do estado do Amazonas (AM) e nas zonas de proteção implantadas no estado do Pará (PA), onde os rebanhos bovinos e bubalinos são submetidos à vacinação massiva e sistemática contra a doença. A região foi dividida em cinco subpopulações amostrais: AP e zona de proteção do PA (Sub1); RR (Sub2); localidade do AM sob influência dos Rios Amazonas e Negro, mais zona de proteção do PA (Sub3); localidade do AM sob influência do Rio Solimões e afluentes (Sub4) e localidade do AM sob influência do Rio Madeira e afluentes (Sub5). Em cada subpopulação amostral foram conduzidos estudos independentes de detecção em duas etapas, com implantação de atividades longitudinais de avaliação clínica e de coleta de amostras de soro sanguíneo para avaliação de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA. A população de estudo foi representada por bovinos e bubalinos de 6 a 24 meses de idade. Todo o trabalho envolveu a vigilância em 1.766 propriedades rurais agrupadas em 1.543 unidades primárias de amostragem, com coleta de amostras e exames clínicos de boca e patas em 34.672 bovinos e bubalinos. Os resultados das investigações clínicas e epidemiológicas e dos testes laboratoriais para identificação de anticorpos contra PNEs e para pesquisa viral, assim como da análise da distribuição espacial das UPAs com animais soropositivos ou indeterminados, contribuíram para apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da FA na região. A sensibilidade deste componente do sistema de vigilância variou de 94,2% a 95,6% entre as subpopulações amostrais, e a probabilidade da região estar livre de transmissão do vírus da FA, considerando uma probabilidade a priori conservadora de 20% de infecção, foi de 99%.

Palavras-chave: FMD, testes DIVA, proteína não-estrutural, zona livre, análise espacial

Introdução

No Brasil, a decisão pela erradicação da febre aftosa (FA) ocorreu a partir do início da década de 1980, após a implantação das primeiras campanhas de luta contra a doença, em 1963 (BRASIL, 1983; REVISÃO..., 1992). Entre as estratégias previstas, destacam-se a regionalização das ações de defesa sanitária animal, com base nos circuitos pecuários, e a implantação gradativa de zonas livres da doença, considerando as normas do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA (BRASIL, 2007a), fundamentadas nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE. O reconhecimento de zonas livres pela OIE envolve, entre outras questões, a certificação da qualidade do serviço veterinário, observando a disponibilidade de sistema de vigilância, e a capacidade de demonstração, em bases científicas, de ausência de infecção ou transmissão do agente viral (OIE, 2016a).

Os primeiros resultados no país foram obtidos em 1998, com reconhecimento pela OIE da primeira zona livre de FA com vacinação, em escala mundial, constituída pelos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. A partir deste primeiro reconhecimento, mesmo diante de reintroduções da doença nos anos 2000 e 2001, no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2002), o processo de implantação de zonas livres evoluiu rapidamente, chegando em 2003 com metade do país reconhecida como livre da doença envolvendo, aproximadamente, 80% do rebanho comercial susceptível à FA, localizado nas unidades da Federação com maior expressão pecuária e potencial exportador. A partir deste período, a implantação de zonas livres ocorreu de forma mais lenta devido a dois fatores principais. O primeiro, relacionado com a instabilidade epidemiológica observada na Região do Cone Sul, registrando-se constantes reintroduções da doença em países ou zonas livres, o que demandou grande esforço regional para fortalecimento dos sistemas nacionais de vigilância e restabelecimento da credibilidade internacional da região (NARANJO e COSIVI, 2013). Como consequência, além das reintroduções observadas em 2000 e 2001, o país foi atingido em 2005 e 2006 por mais uma ocorrência da doença nos estados do Mato Grosso do Sul e do Paraná, levando à suspensão da condição zoossanitária de grande parte do território nacional, cuja recuperação ocorreu apenas em 2008 e 2009 (BRASIL, 2008). Como segundo fator, destacam-se as próprias características do sistema agropecuário de grande parte das Regiões Norte e Nordeste do país. Nestas Regiões, a produção pecuária é voltada basicamente para abastecimento local, revelando pouco interesse social e econômico para participação do mote da erradicação com vistas ao mercado exportador. Destacam-se, também, as particularidades geográficas, como parte da Região Amazônica, dificultando a implantação e manutenção de sistemas de defesa sanitária animal nos padrões

utilizados nas demais regiões brasileiras. Essas condições locais, exigiram maior presença e participação do setor público, buscando um arranjo político e econômico para viabilizar a execução do PNEFA. No período de 2007 a 2016, segundo relatórios internos do PNEFA, os governos federal e estaduais investiram cerca de US\$180 milhões no sistema de defesa sanitária animal das unidades da Federação sem reconhecimento internacional de livre da doença. Os investimentos realizados possibilitaram novos avanços nos anos de 2010 e 2013 (OIE, 2016b), com o país chegando ao final de 2016 com 77% do território nacional e 99% do rebanho doméstico susceptível à doença incluídos em zonas livres de FA (PANAFTOSA, 2016). A partir de 2013, os esforços do país dirigiram-se a dois temas principais: i) incorporação da área restante da Região Amazônica na zona livre de FA com vacinação, e; ii) definição das estratégias de evolução da condição zoossanitária do país para livre de FA sem vacinação, tendo como orientação principal o Guia Técnico de Trabalho elaborado pelo Centro Pan Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) e por representantes dos serviços veterinários dos países da América do Sul (PANAFTOSA, 2011 e 2015).

O presente artigo dedica-se ao primeiro tema, tendo por objetivo avaliar a transmissão viral em parte da Região Amazônica, nos anos de 2014 e 2015, dentro do último projeto brasileiro de ampliação da zona livre de febre aftosa com vacinação. Diferente dos trabalhos realizados no país nos estudos anteriores, onde a movimentação animal e os fatores de risco para doença foram elementos determinantes no delineamento amostral, neste estudo, os principais elementos considerados na avaliação de transmissão viral foram as características geográficas e a distribuição e concentração espacial dos rebanhos bovinos e bubalinos. O trabalho foi coordenado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e executado pelos serviços veterinários estaduais, contando com colaborações do PANAFTOSA na fase de delineamento.

Material e métodos

Área geográfica envolvida

O estudo foi conduzido nos estados do Amapá (AP) e de Roraima (RR), na quase totalidade do estado do Amazonas (AM) e em partes do estado do Pará (PA). No AM, a área avaliada representou 97% do território estadual, desconsiderando apenas os Municípios de Boca do Acre e de Guajará, divisa com estado do Acre, integrados à zona livre de FA com vacinação em 2005, e parte dos Municípios de Lábrea e Canutama, divisa com o estado de Rondônia, reconhecidos como zona livre de FA com vacinação em 2010. No PA, o trabalho foi realizado nas zonas de proteção implantadas nas divisas com AM e AP, representando cerca de 5% do território estadual. Informações gerais sobre as áreas geográficas envolvidas e os rebanhos

susceptíveis existentes estão sintetizadas na Tabela 1. Uma visão geral da área é apresentada na Figura 1, e detalhes mais específicos na Figura 2, esta última elaborada com base em informações geográficas disponibilizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) e obtidas junto ao Projeto TerraClass (http://www.inpe.br/cra/projetos_pesquisas/dados_terraclass.php) que tem como objetivo produzir mapas sistêmicos de uso e cobertura das terras desflorestadas da Amazônia Legal Brasileira (ALMEIDA et al., 2016).

Tabela 01. Informações gerais sobre as regiões envolvidas no estudo de avaliação de transmissão do vírus da FA

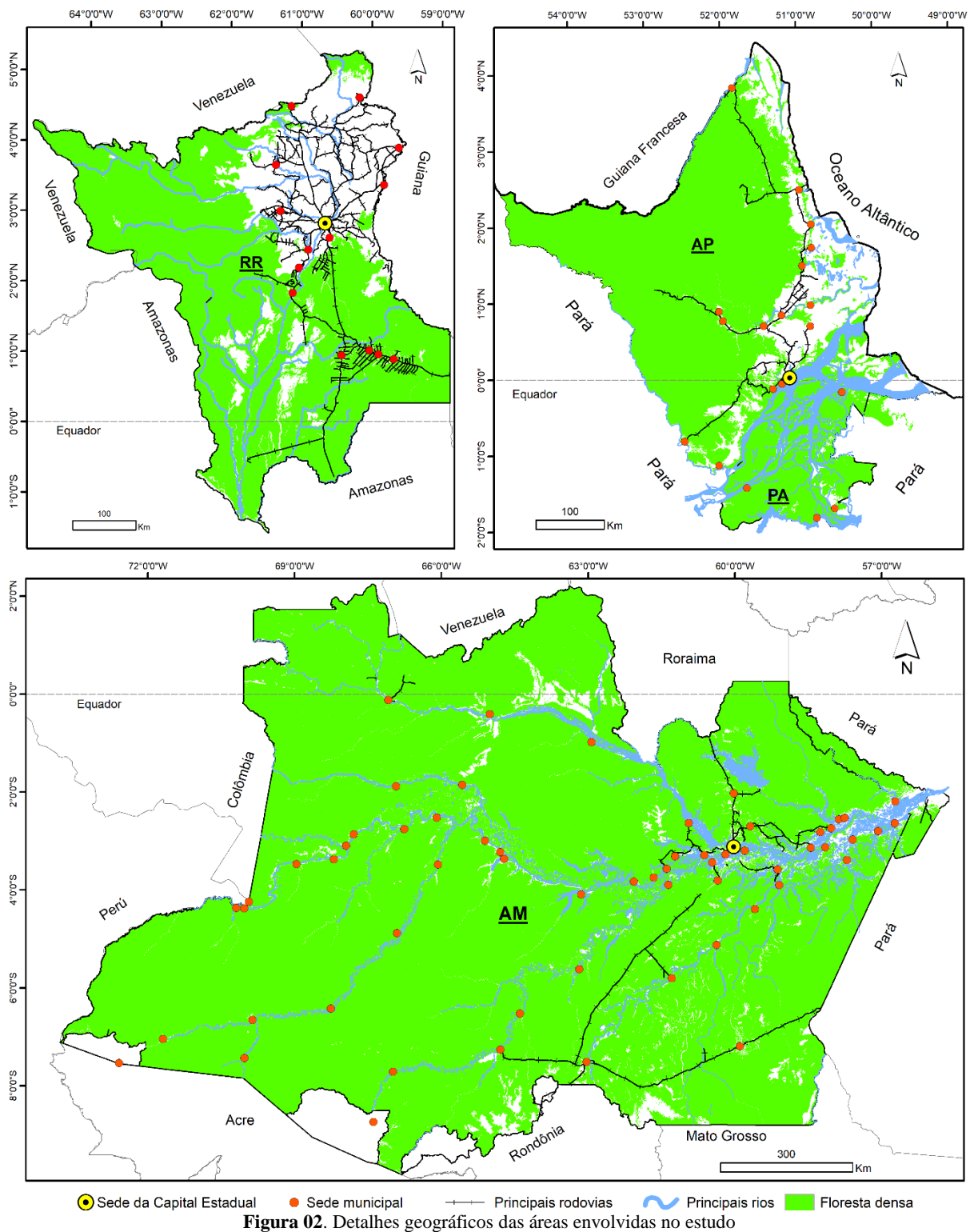
UF	Municípios	Área (km ²)	População residente*	Rebanho das espécies susceptíveis**					
				Bovinos e bubalinos			Suínos	Ovinos	Caprinos
				Propriedades	Bovinos	Bubalinos			
Amazonas – AM	60	1.517.476	3.907.854	15.210	1.234.581	72.765	37.300	21.882	6.786
Amapá – AP	16	142.829	770.903	2.244	53.574	204.209	11.225	3.350	1.444
Pará - PA (divisa com AP)	5	40.166	173.715	462	13.074	103.439	6.182	1.773	1.582
Pará - PA (divisa com AM)	3	17.572	70.971	591	35.890	1.067	2.297	930	564
Roraima – RR	15	224.301	508.736	6.955	784.169	231	30.293	25.012	4.452
Total	99	1.942.344	5.432.179	25.462	2.121.288	381.711	87.297	52.947	14.828

* IBGE - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, 2015;

** Cadastro dos serviços veterinários estaduais, 2016



Figura 01. Condição zoossanitária para FA na América do Sul, ao final de 2016, com destaque para a área envolvida no estudo



Como se observa, em todos os estados predomina a presença de florestas densas, com áreas de aptidão agropecuária concentrando-se no entorno das sedes municipais e das principais estradas e rios. Essa característica é observada principalmente no AM, onde se verifica uma grande dispersão de reduzidas áreas utilizadas para produção agropecuária localizadas no

entorno dos principais rios e nas áreas de expansão territorial nas divisas com os estados do Acre, Mato Grosso e Rondônia, pertencentes à zona livre de FA com vacinação. Na região constituída pelo AP e parte do PA, as áreas de rios ou alagadas e de cobertura florestal representam, aproximadamente, 83% do território estadual, enquanto que em RR, 59%.

De forma global, a região é cercada por países ou zonas livres da doença, com exceção da parte norte de RR, divisa com a Venezuela, país sem reconhecimento de livre de FA, onde estão implantadas medidas de vigilância específicas e uma zona de proteção. Em toda a região proposta para ampliação da zona livre de FA com vacinação houve poucos registros de ocorrência da doença, com o último caso notificado em setembro de 2004, no AM. Esta ocorrência foi causada por vírus C, ficando limitada ao Município de Careiro da Várzea e seus limítrofes, localizados nas proximidades da capital Manaus.

Nos quatro estados, assim como em toda zona livre de FA com vacinação, apenas os rebanhos bovinos e bubalinos são submetidos à vacinação massiva e sistemática contra a FA. No AM, os rebanhos são vacinados duas vezes ao ano. Parte deste rebanho, localizada em 41 municípios da calha do Rio Amazonas e na zona de proteção contígua no PA, é vacinada nos meses de março/abril e julho/agosto, e outra parte localizada nos demais municípios do AM é vacinada nos meses de maio e novembro. No AP e na zona de proteção contígua do PA, a vacinação é anual, durante os meses de novembro e dezembro, e em RR ocorre de forma semestral, nos meses de abril e outubro.

Metodologia

Diante das características e particularidades geográficas e produtivas, bem como das relações epidemiológicas existentes entre as diferentes regiões, foram definidas cinco subpopulações amostrais: uma subpopulação representada pelo AP e zona de proteção contígua do PA (denominada Sub1), distante, aproximadamente, 400 km das outras subpopulações; uma subpopulação constituída por RR (Sub2); e três subpopulações na região representada pelo AM e zona de proteção contígua do PA. Nesta região, as subpopulações foram definidas com base na influência dos rios principais: Sub3, associada aos Rios Amazonas e Rio Negro; Sub4, associada ao Rio Solimões e seus afluentes; e Sub5, ao Rio Madeira e afluentes (Figura 3).

Para investigação de transmissão do vírus da FA, foram conduzidos estudos de detecção em duas etapas (CAMERON e BALDOCK, 1998; ZILLER et al., 2002; FAO, 2014; OIE, 2014), com implantação de atividades longitudinais de avaliação clínica e de coleta de amostras de soro sanguíneo, visando a identificação de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA.

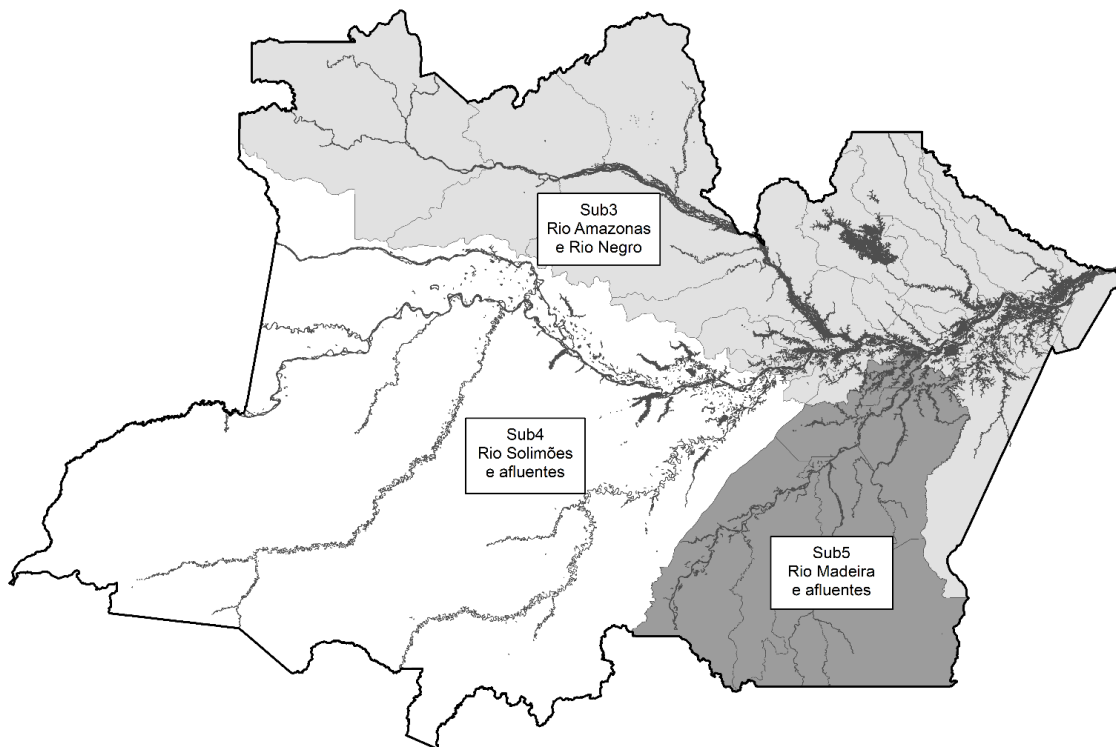


Figura 03. Organização do estado do Amazonas e zona de proteção do Pará em três subpopulações amostrais

A população sob estudo foi constituída por bovinos ou bubalinos de 6 a 24 meses de idade agrupados em propriedades rurais. Os bovinos e bubalinos representam as espécies de maior suscetibilidade para as cepas virais predominantes na América do Sul (OLASCOAGA et al., 1999), e a faixa etária considerada é a de maior suscetibilidade ao agente viral em regiões com vacinação sistemática, considerando especialmente o menor número de vacinações recebidas. Os suínos e os pequenos ruminantes estão disponíveis em menor quantidade e não desempenham papel de relevância epidemiológica para persistência das cepas virais prevalentes na América do Sul (DORA e PETRY, 1984; OLASCOAGA et al., 1999), de forma que essas espécies não foram consideradas no delineamento amostral.

A investigação foi realizada de forma independente em cada subpopulação amostral, considerando as seguintes hipóteses epidemiológicas, utilizadas nos diferentes estudos realizados no país: i) caso exista transmissão viral em pelo menos 1% das propriedades rurais com bovinos ou bubalinos até 24 meses de idade, espera-se, com 95% de confiança, detectar pelo menos uma propriedade positiva; e ii) se em cada propriedade com transmissão viral existirem, pelo menos, 10% (em rebanhos com até 500 bovinos) ou 5% (em rebanhos com 500 ou mais bovinos) de bovinos ou bubalinos com até 24 meses de idade infectados, a probabilidade de encontrar pelo menos um animal positivo em cada uma delas é de 95%. As prevalências intrarrebanho utilizadas foram bastante conservadoras, considerando as últimas ocorrências da doença registradas no país e em países da América do Sul, assim como a investigação sorológica realizada na área interdita dos focos de FA registrados no estado do Mato Grosso do Sul, em 2005 (BRASIL, 2008).

O total de propriedades rurais (entendidas como unidades primárias de amostragem - UPAs) para investigação em cada subpopulação foi definido utilizando-se o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, disponibilizado pelo *Animal Health Services – AusVet* (MARTIN et al., 1992; EPITOOLS, 2014; SERGEANT, 2015). Cada UPA representou um *cluster* definido como propriedade, ou agrupamento de propriedades com proximidade física, constituído por animais com probabilidade semelhante de terem contato com o vírus da FA caso exista algum animal infectado dentro do grupo (ZILLER et al., 2002). Os parâmetros utilizados para cálculo do número de UPAs, em cada subpopulação amostral, foram estabelecidos conforme a hipótese epidemiológica apresentada. A especificidade utilizada foi de 100%, considerando que cada UPA com pelo menos um animal com sinais clínicos compatíveis com doença vesicular ou resultado soropositivo foi submetida a investigações complementares de forma a descartar ou confirmar a presença de infecção. De forma a compensar qualquer perda no processo de constituição da amostra, o total de UPAs foi ampliado entre 2% e 8%, segundo as subpopulações amostrais.

A seleção das propriedades rurais em cada subpopulação amostral foi realizada pelo MAPA e ocorreu de forma aleatória e proporcional à população de bovinos e bubalinos distribuída em categorias de tamanho de rebanhos. Essas categorias, por sua vez, foram definidas dividindo a distribuição das propriedades rurais em três quantis, segundo o número de bovinos ou bubalinos existentes em cada propriedade, e foram classificadas como pequenas, médias e grandes. A partir da lista de propriedades selecionadas para o estudo, os serviços veterinários estaduais realizaram as visitas de campo para constituir as UPAs e dar início às atividades de vigilância dirigidas à detecção de transmissão viral. Todas as propriedades selecionadas para o estudo passaram a ser monitoradas, com as atividades sendo registradas em formulários específicos, contemplando informações sobre a localização geográfica da propriedade rural, quantitativo dos rebanhos susceptíveis existentes, total de animais susceptíveis nascidos e mortos entre as inspeções, sistema de produção predominante (corte, leite ou misto) e resultados dos exames clínicos realizados, entre outros dados. Todas as informações foram inseridas em sistema informatizado disponibilizado pelo MAPA.

Em cada UPA foram selecionados, de forma aleatória, bovinos ou bubalinos de 6 a 24 meses para avaliação clínica e para coleta de amostras de soro sanguíneo visando a detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA. Os animais selecionados receberam identificação individual de longa duração e permaneceram sem vacinação contra a FA até o final da investigação. De forma a evitar as limitações para avaliação de transmissão viral em pequenos rebanhos, destacadas por Paton et al. (2004), e garantir uma sensibilidade de rebanho em cada UPA de, pelo menos, 95%, conforme discutido por Greiner e Dekker (2005), foi estabelecido

um número mínimo de 10 bovinos ou bubalinos de 6 a 24 meses nas propriedades classificadas como pequenas ou médias, e de 20 bovinos ou bubalinos nas propriedades grandes. Dessa forma, quando na inspeção das propriedades selecionadas fossem identificados rebanhos com menos de 10 ou 20 bovinos de 6 a 24 meses de idade, de acordo com sua classificação, outras propriedades localizadas na vizinhança eram incluídas ao estudo até a UPA completar o número mínimo estabelecido de bovinos ou bubalinos jovens.

Para avaliação de anticorpos contra PNEs do vírus da FA foram utilizados dois testes em série. Como teste de triagem foi utilizado o ELISA 3ABC, PrioCHECK®, com valores de sensibilidade e especificidade de 92,5% (IC95%: 86,3 – 97,4) e 97,8% (IC95%: 95,9 – 99,2), respectivamente, segundo Goris et al. (2007). Para confirmação, foi utilizada a prova *Western Blot de Imunoeletrotransferência* – EITB, do PANAFTOSA, que, segundo o fabricante, apresenta sensibilidade próxima a 100% e especificidade de 99%, em bovinos menores de 24 meses de idade e em rebanhos vacinados (PANAFTOSA, 2012a, 2012b).

Para definição do número de animais para amostragem e exames clínicos em cada UPA, também foi utilizado o aplicativo *EpiTools epidemiological calculators*, considerando os parâmetros da hipótese epidemiológica considerada.

As amostras de soro sanguíneo foram enviadas para processamento pela rede de laboratórios do MAPA, associadas às seguintes informações para cada animal amostrado: identificação única; idade, em meses; sexo; número de vacinações aplicadas no animal durante sua permanência na propriedade; origem do animal, se nascido ou não na propriedade; e resultado das inspeções clínicas de boca e de patas.

Após os resultados da primeira coleta, nas UPAs onde todas as amostras foram negativas e não foram encontrados sinais clínicos compatíveis com doença vesicular, as propriedades rurais foram liberadas após inspeção final pelo serviço veterinário estadual. Em todas as inspeções foram realizados exames clínicos de boca e de patas nos animais amostrados.

As UPAs com pelo menos um resultado soropositivo ou indeterminado foram classificadas como possivelmente infectadas, dando origem à investigação epidemiológica complementar. As propriedades integrantes dessas UPAs permaneceram no estudo para realização de coleta pareada e novos exames clínicos. A coleta pareada constitui uma das estratégias previstas no Código Terrestre da OIE (item 1, Art. 8.8.42, ver 2016), para seguimento dos resultados soropositivos, representando a coleta de amostras de soro sanguíneo nos mesmos animais amostrados na coleta imediatamente anterior. Para isso, como mencionado, os animais receberam identificação individual de longa duração e permaneceram sem vacinação contra a FA durante todo o estudo.

Com base nos resultados da coleta pareada e dos exames clínicos complementares, as propriedades pertencentes a UPAs sem permanência de animais soropositivos ou indeterminados e sem evidências clínicas de doença vesicular foram liberadas após inspeção final pelo serviço veterinário estadual. Nas UPAs com permanência de pelo menos um animal soropositivo ou indeterminado após a coleta pareada, as atividades de investigação complementar foram mantidas, incluindo novos exames clínicos e avaliação epidemiológica. Em todos os bovinos ou bubalinos que permaneceram ao final do estudo com resultados indeterminados ou soropositivos foi prevista a realização de três coletas de amostras de líquido esofágico-faríngeo (LEF), em intervalo de 15 dias, para pesquisa viral por meio de teste de reação em cadeia da polimerase de transcrição inversa, em tempo real - RT-PCR (OIE, 2016b).

A análise espacial, visando a identificação de *clusters*, foi conduzida utilizando-se a associação de dois métodos complementares, um do tipo global e outro do tipo focal ou local (BRASIL, 2007b; DOHOO, 2010). Para as análises, cada UPA foi classificada como positiva (caso) ou negativa (controle), com base na presença de animais soropositivos ou indeterminados após a primeira coleta. Foram considerados dois cenários: um interpretando os resultados indeterminados como negativos e outro, como positivos.

Como teste global, foi utilizada a *Função-K de Ripley* (RIPLEY, 1977), conforme descrito por Negreiros et al. (2009) em trabalho que analisou a aglomeração espacial dos focos de FA registrados no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de outubro a dezembro de 2005. Para análise foi utilizada a biblioteca *Splancs* (ROWLINGSON e DIGGLE, 1993) com os softwares livres *R versão 3.3.1* (2016-06-21) e *Rstudio - Versão 0.99.902*.

Para o teste de detecção de aglomerados, foi realizada investigação por meio de estatística de varredura espacial (*Spatial Scan Statistic*), com o *software* Livre *SATScan v9.4.2 64-bit*, com a seguinte configuração: análise puramente espacial; modelo de probabilidade discreta de *Bernoulli* (casos e controles); varredura para áreas com altas taxas (*clusters* positivos); nível de significância de 5%; e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km (CUZICK e EDWARDS, 1990; KULLDORFF, 1997).

Por fim, foi levantada a estimativa dos custos diretos para realização dos estudos, considerando: despesas com reuniões técnicas de planejamento e padronização das atividades; aquisição dos materiais básicos utilizados para identificação dos animais e para realização das atividades de coleta, armazenamento, transporte e remessa das amostras; gastos com combustível nas atividades de deslocamento às propriedades rurais; e custos com testes de diagnóstico.

Resultados e discussão

Período de realização das atividades de campo

Considerando as subpopulações em conjunto, as atividades de campo foram conduzidas no período de setembro de 2014 a setembro de 2016. As atividades de inspeção inicial para constituição das UPAs e de primeira coleta de soro sanguíneo concentraram-se até junho de 2015, quando foram registradas 76% do total de inspeções. As ações de investigação complementar, incluindo coleta pareada, inspeções de monitoramento e coletas de LEF, estenderam-se nos semestres seguintes, com 91% das atividades finalizadas até dezembro de 2015.

Os maiores prazos para realização das atividades de investigação complementar foram identificados especialmente na Sub1 e nas Subpopulações do AM e PA devido às condições climáticas e geográficas, dificultando, ou até mesmo limitando, o acesso às propriedades rurais. Nestas subpopulações, o trabalho foi distribuído durante o período de dois anos, sendo que cerca de 70% das atividades foram concluídas ao final do primeiro semestre de 2015, contemplando especialmente as inspeções para constituição das UPAs e de coleta inicial de amostras de soro sanguíneo. Na Sub2, onde há melhores condições de acesso às propriedades rurais, o trabalho foi realizado no prazo de um ano (setembro de 2014 a setembro de 2015), com 98% das atividades concentrando-se no período de nove meses.

Especificamente o período de primeira coleta de amostras, que representou a etapa transversal do estudo de avaliação de transmissão viral, pode ser avaliado por meio da Figura 4, segundo subpopulação amostral. Na Sub1 a primeira coleta foi distribuída em quatro meses; na Sub2, 91% das coletas foram realizadas em dois meses; e nas Subpopulações do AM e PA, a maior parte das coletas ocorreu em um período de três meses, sendo 75% na Sub3, 95% na Sub4 e 99% na Sub5.

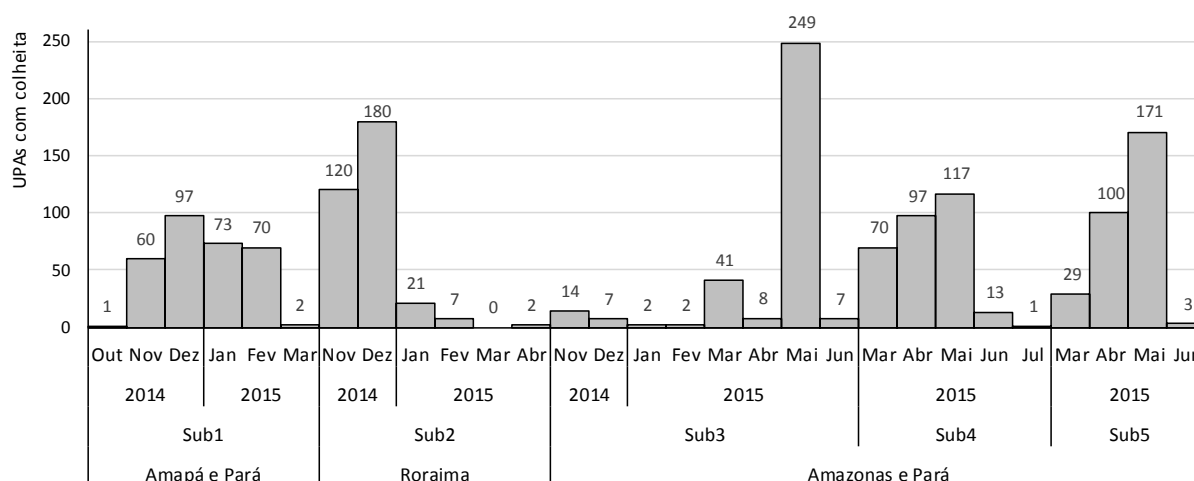


Figura 04. Quantidade mensal de UPAs com primeira coleta de amostras, segundo subpopulação amostral

Características e informações gerais sobre a amostragem realizada

Informações sobre a amostragem prevista e realizada estão resumidas na Tabela 2. De forma geral, a meta para o número de UPAs por subpopulação amostral foi satisfatoriamente atendida. A maior perda, quanto ao total de UPAs, foi registrada na Sub1 (5% de redução), entretanto, dentro da margem de 8% de segurança utilizada nesta subpopulação. O percentual de UPAs, segundo a categoria de tamanho de rebanhos, também ficou próximo dos valores esperados.

Quanto ao número de propriedades para constituição das UPAs, como esperado, a formação de conglomerados ficou concentrada nas duas primeiras categorias de tamanho de rebanhos. Na Sub1, apenas 6% (17/303) das UPAs foram constituídas por duas ou três propriedades; na Sub2, 4% (12/330) foram constituídas por duas propriedades; e, no conjunto das Sub3 a Sub5, 16% (147/908) tiveram mais de uma propriedade, variando de 2 a 5 estabelecimentos por UPA.

Na Sub1, em 98,7% das UPAs (299/303) foi atendida a condição mínima de bovinos até 24 meses por UPA (10 ou 20 bovinos entre 6 e 24 meses de idade); na Sub2, apenas em uma UPA a quantidade prevista não foi atendida; e nas Subpopulações AM e AP (Sub3, Sub4 e Sub5), a condição foi atendida em 98,6% das UPAs (895/908).

O tipo de exploração pecuária predominante nas propriedades investigadas foi destinada à produção de carne, representando a finalidade principal em 79,5% das propriedades na Sub1; 78,2% na Sub2 e 68,1% nas Subpopulações AM e PA. A presença de pequenos ruminantes e suínos nas UPAs foi de 4,7% na Sub1; de 9,3% na Sub2 e de 6,1% nas Subpopulações do AM e PA.

Majoritariamente, os animais amostrados eram nascidos nas propriedades rurais (89% do total do estudo), dos quais 25% não apresentavam registro de vacinação contra a FA e 37% registro de apenas uma vacinação. Quanto à faixa etária, 53% dos animais amostrados tinham entre 6 e 12 meses de idade, 31% entre 13 e 18 meses de idade, e 16% entre 19 e 24 meses, caracterizando o predomínio de unidades amostrais de maior susceptibilidade à doença em populações submetidas a vacinação sistemática e massiva.

Tabela 02. Informações sobre a amostra prevista e realizada, total de propriedades envolvidas, rebanhos susceptíveis existentes e total de amostras coletadas, segundo categoria de tamanho de rebanho e subpopulação amostral

Subpopulação	Categoria (tamanho do rebanho)	Total de UPAs				Propriedades		Rebanho bovino*				Bovinos amostrados*		
		Previsto	Realizado	Diferença	Total	Média por UPA	Até 24 meses	Total	Ovinos	Caprinos	Suínos	Total**	Média por UPA	
Sub1	Até 19 bovinos	10	8	3%	-2	15	1,5	109	221	12	0	82	93	9
	20 a 61 bovinos	25	33	11%	8	39	1,6	675	1.523	70	22	177	482	19
	>61 bovinos	285	262	86%	-23	267	0,9	48.401	121.786	1.657	1.063	3.049	6.982	24
	Total Subpopulação	320	303		-17	321	1,0	49.185	123.530	1.739	1.085	3.308	7.557	24
Sub2	Até 32 bovinos	20	19	6%	-1	25	1,3	329	643	148	0	71	233	12
	33 a 80 bovinos	50	51	15%	1	53	1,1	1.341	3.050	178	80	229	882	18
	>80 bovinos	260	260	79%	0	264	1,0	29.628	71.852	4.533	768	1.725	6.796	26
	Total Subpopulação	330	330		0	342	1,0	31.298	75.545	4.859	848	2.025	7.911	24
Sub3	Até 18 bovinos	19	17	6%	-2	45	2,6	252	582	135	21	1.063	183	11
	19 a 46 bovinos	58	54	17%	-4	78	1,4	1.150	2.684	102	30	203	776	14
	>46 bovinos	232	238	77%	6	271	1,1	17.230	40.573	710	227	779	5.449	23
	Total Subpopulação	309	309		0	394	1,3	18.632	43.839	947	278	2.045	6.408	21
Sub4	Até 10 bovinos	14	13	4%	-1	27	2,1	127	255	2	0	90	106	8
	11 a 28 bovinos	39	42	14%	3	66	1,6	651	1.329	169	24	192	483	12
	>28 bovinos	247	243	82%	-4	293	1,2	16.438	36.883	1.208	358	889	5.535	23
	Total Subpopulação	300	298		-2	386	1,3	17.216	38.467	1.379	382	1.171	6.124	21
Sub5	Até 21 bovinos	14	12	4%	-2	20	1,7	156	350	4	8	2	115	10
	22 a 65 bovinos	48	48	16%	0	52	1,1	1.137	2.264	182	7	206	663	14
	>65 bovinos	243	243	80%	0	251	1,0	26.037	54.235	762	285	1.362	5.894	24
	Total Subpopulação	305	303		-2	323	1,1	27.330	56.849	948	300	1.570	6.672	22

* Inclui bovinos e bubalinos ** Referente ao total de bovinos e bubalinos amostrados na primeira coleta e com amostras processadas pelo laboratório

Atividades de vigilância clínica

Em todo o estudo foi registrada uma média de 2,6 inspeções por UPA na Sub1; de 4,8 na Sub2; e de 1,8 nas Subpopulações AM e PA. Durante as atividades de monitoramento, considerando todas as subpopulações, foi registrada a realização de 74.136 exames clínicos de boca e de patas em animais susceptíveis com registro de 1.038 sinais clínicos (1,4% do total). Todas as investigações realizadas pelo serviço veterinário oficial descartaram ocorrência de FA.

Considerando o conjunto das subpopulações, nas UPAs investigadas foi registrado nascimento de 22.824 bovinos e bubalinos, 269 pequenos ruminantes e 789 suínos. Foram registradas 2.984 mortes de animais susceptíveis, tendo como principais causas, segundo declaração dos entrevistados: acidentes nas propriedades (especialmente por afogamento ou atolamento); desnutrição; ataque de animais peçonhentos e ingestão de plantas tóxicas.

Análise dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs

Durante a primeira coleta de amostras de soro sanguíneo para avaliação de anticorpos contra PNEs do vírus da FA, de forma geral, foram encaminhadas à rede de laboratórios do MAPA 34.878 amostras das quais, 99,4% foram validadas e processadas. Os resultados estão sintetizados na Tabela 3, segundo subpopulação amostral. O percentual de animais soropositivos variou de 0%, na Sub1, a 0,41% na Sub4, valores dentro do padrão de especificidade agregada do sistema laboratorial utilizado. Quanto aos resultados indeterminados, foram identificados percentuais variando entre 0,05%, na Sub1, a 0,86% Sub3. De forma conservadora, todos os resultados indeterminados foram tratados como soropositivos, gerando ações de investigação complementar.

De forma conjunta para todos os estudos, em 87% (1341/1543) das UPAs não foram identificados animais soropositivos ou com resultados indeterminados. O trabalho nessas UPAs foi encerrado após realização de inspeção final de monitoramento. A investigação prosseguiu nas 202 UPAs restantes, onde foram realizadas novas inspeções de monitoramento e realizada coleta pareada, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente para as UPAs classificadas como indeterminadas e como positivas.

Tabela 03. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta, por subpopulação amostral

Subpopulação	Amostra		Resultados das UPAs		Resultados dos bovinos/bubalinos	
	UPAs	Bovinos/bubalinos	Indeterminada ¹	Positiva ²	Indeterminado ³	Positivo ⁴
Sub1	303	7.557	4	0	4	0
Sub2	330	7.911	25	10	29	11
Sub3	309	6.408	44	15	55	16
Sub4	298	6.124	33	23	45	25
Sub5	303	6.672	33	15	41	15
Total	1.543	34.672	139	63	174	67

1. UPA indeterminada = UPA com pelo menos um bovino ou bubalino com resultado indeterminado para o teste confirmatório

2. UPA positiva = UPA com pelo menos um bovino ou bubalino com resultado positivo ao teste confirmatório

3. Animal com resultado indeterminado ao teste confirmatório - 4. Animal com resultado positivo ao teste confirmatório

Tabela 04. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs sem animais soropositivos, mas com pelo menos um animal indeterminado na coleta 1, por subpopulação amostral

Subpopulação	Previsto		Realizado			Resultados das UPAs		Resultados das amostras		
	UPAs	Amostras	UPAs	Amostras		Indeterminada	Positiva	Indeterminada	Positiva	
Sub1	4	99	4	100%	76	77%	0	0	0	0
Sub2	25	677	25	100%	643	95%	1	0	1	0
Sub3	44	923	44	100%	779	84%	2	1	2	1
Sub4	33	750	31	94%	638	85%	2	1	2	1
Sub5	33	766	31	94%	619	81%	2	0	2	0
Total	139	3.125	135	97%	2.775	86%	7	2	7	2

Tabela 05. Resultados dos testes para avaliação de anticorpos contra PNEs, referentes à primeira coleta e coleta pareada, nas UPAs com pelo menos um bovino ou bubalino soropositivo na coleta 1, por subpopulação amostral

Subpopulação	Previsto		Realizado			Resultados das UPAs		Resultados das amostras		
	UPAs	Amostras	UPAs	Amostras		Indeterminada	Positiva	Indeterminada	Positiva	
Sub1	0	0	0	---	0	---	0	0	0	0
Sub2	10	260	10	100%	251	97%	0	0	0	0
Sub3	15	352	15	100%	303	86%	1	1	1	1
Sub4	23	508	23	100%	439	86%	0	2	1	3
Sub5	15	412	15	100%	312	76%	0	1	0	1
Total	63	1.532	63	100%	1.305	85%	1	4	2	5

Na Sub1, foram registradas apenas UPAs indeterminadas, três localizadas no AP e uma no PA. Em cada UPA foi identificado um animal com resultado indeterminado, sendo que três foram incluídos na coleta pareada, apresentando resultados negativos, e um, localizado no AP, morreu por causa indeterminada (UPA AP158). Nesta UPA, a amostra inicial envolveu 20 bovinos com idade entre 6 e 18 meses e com histórico de 2 a 3 vacinações contra a FA. Na coleta pareada, dos 20 animais amostrados na primeira coleta, 15 foram recuperados, todos com resultados negativos para os testes de detecção de anticorpos contra PNEs.

Na Sub2, todas as 35 UPAs previstas para investigação complementar (25 indeterminadas e 10 positivas) foram inspecionadas e realizada a coleta pareada, com recuperação de 95,4% dos animais amostrados na primeira coleta. Dos 11 animais soropositivos na primeira coleta, nove foram incluídos na coleta pareada, obtendo resultados negativos. Em duas UPAs (RR227 e RR236) os animais soropositivos não foram incluídos na coleta pareada, um devido à perda de brinco e outro por não ter sido encontrado. Na UPA RR227, a amostra inicial envolveu 31 animais entre 6 e 18 meses de idade e com histórico de 1 ou 2 vacinações, dos quais 29 foram recuperados para coleta pareada e apresentaram resultados negativos aos testes laboratoriais utilizados. Na UPA RR236, foram coletadas 21 amostras de animais com 8 a 12 meses de idade e histórico de uma vacinação contra a FA, sendo que 18 foram incluídos na coleta pareada, apresentando resultados negativos. Entre as UPAs classificadas como indeterminadas na primeira coleta, todos os 29 animais com resultados indeterminados foram incluídos na coleta pareada, obtendo resultados negativos para detecção de anticorpos contra PNEs. Apenas um bovino, localizado na UPA RR133, soroconverteu de negativo para indeterminado, sendo submetido a três coletas de LEF, nas datas de 28/08, 04/09 e 18/09/2015, com resultados negativos para detecção de RNA do vírus da FA.

No conjunto das subpopulações do AM e PA (Sub3, Sub4 e Sub5), todas as 53 UPAs classificadas como positivas após primeira coleta foram inspecionadas e submetidas à coleta pareada, com recuperação de 83% dos animais amostrados. Entre os 56 animais soropositivos na primeira coleta, 46 (82%) foram incluídos na coleta pareada, todos com resultados negativos para anticorpos contra PNEs do vírus da FA. As causas que impediram a coleta de amostras de 10 animais soropositivos foram: morte por ingestão de planta tóxica (2); morte por acidentes durante o manejo (2); não encontrados (2); morte devido à acidente ofídico (1); enviado ao abate (1); perda de brinco (1) e morte não determinada (1). Após a coleta pareada, em cinco UPAs (AM170, AM436, AM441, AM534 e AM749) quatro animais negativos e um indeterminado soroconverteram para positivos, e dois negativos soroconverteram para indeterminados. Nas UPAs AM170 e AM436, os três animais soropositivos foram submetidos a três coletas de LEF, com resultados negativos para detecção de RNA do vírus da FA. Nas UPAs AM441, AM534 e AM749, dois animais soropositivos e dois indeterminados morreram; um por ingestão de planta tóxica e três atolados na várzea.

Ainda em relação ao conjunto de subpopulações do AM e PA, das 110 UPAs classificadas como indeterminadas na primeira coleta, 106 (96%) foram submetidas à coleta pareada. Das quatro UPAs onde a coleta pareada não pode ser realizada, duas localizam-se na Sub4 (AM438 e AM840) e duas na Sub5 (AM073 e AM745), e os motivos para não realização

desta atividade foram dificuldades de acesso às propriedades (UPAs AM438, AM840 e AM745) e perda de brinco (UPA AM073). Do total de 127 bovinos com resultado indeterminado, 97 (76%) foram incluídos na coleta pareada, 95 tornaram-se negativos e dois mantiveram resultados indeterminados, sendo submetidos a três coletas de LEF, com resultados negativos pela técnica RT-PCR. Os motivos para não realização da segunda coleta em 30 animais com resultado indeterminado foram: perda de brinco (5); animal não encontrado (5); dificuldade de acesso à propriedade (4); acidente ofídico (3); ingestão de planta tóxica (3); animal comercializado (2); desnutrição (2); morte por causa indeterminada (2); atolamento (1); ataque de animais (1); morte durante briga (1); e vendido para abate (1). Entre os animais negativos na primeira coleta, dois soroconverteram para positivo (UPAs AM340 e AM771) e quatro para indeterminado (UPAs AM062, AM227, AM463 e AM580). Dos animais soropositivos, um não foi encontrado para coleta de LEF e outro foi submetido a três coletas com resultados negativos para a técnica RT-PCR. Entre os animais com resultado indeterminado na coleta pareada, dois foram submetidos a três coletas de LEF, com resultados negativos para detecção de RNA do vírus da FA; um foi encontrado morto (causa não determinada) e outro, abatido para consumo na propriedade.

A distribuição espacial das UPAs, segundo as subpopulações amostrais e classificação quanto à presença de animais indeterminados ou positivos, está disponível nas Figuras 5 a 7.

Para verificar a viabilidade epidemiológica da formação de clusters em cada subpopulação amostral, inicialmente foi avaliada a distância linear entre as UPAs, identificando-se, para cada uma, a distância entre o vizinho mais próximo, por meio de matriz de proximidade. Trata-se, evidentemente, de uma avaliação simplificada, considerando apenas a distância linear entre as sedes das propriedades rurais envolvidas. A análise descritiva apresentada na Tabela 6 e Figura 8, evidencia proximidades médias entre as UPAs compatíveis com a possibilidade de ocorrência de agrupamentos de rebanhos infectados, diante da presença do agente viral nas subpopulações amostrais. Apesar da ocorrência de valores discrepantes (*outliers*), especialmente nas subpopulações do AM e PA, em termos gerais, observa-se que mais de 97% do total de UPAs estão próximas de outra UPA a uma distância inferior a 25 km. Considerando apenas as UPAs indeterminadas ou positivas, mais de 90% dessas UPAs apresentaram pelo menos uma UPA a uma distância linear de até 25 km. O raio de 25 km foi utilizado como parâmetro, tendo como referência principal as últimas ocorrências da doença no estado do Mato Grosso do Sul (Negreiros et al., 2009).

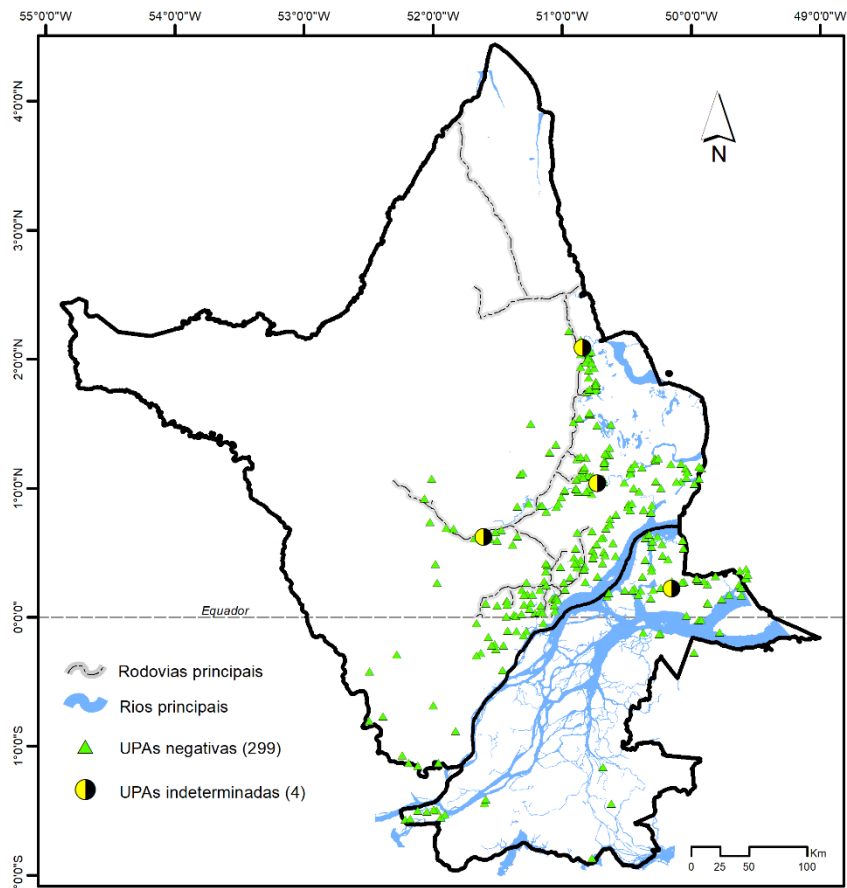


Figura 05. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo realizado na Sub1 (Amapá e Pará)

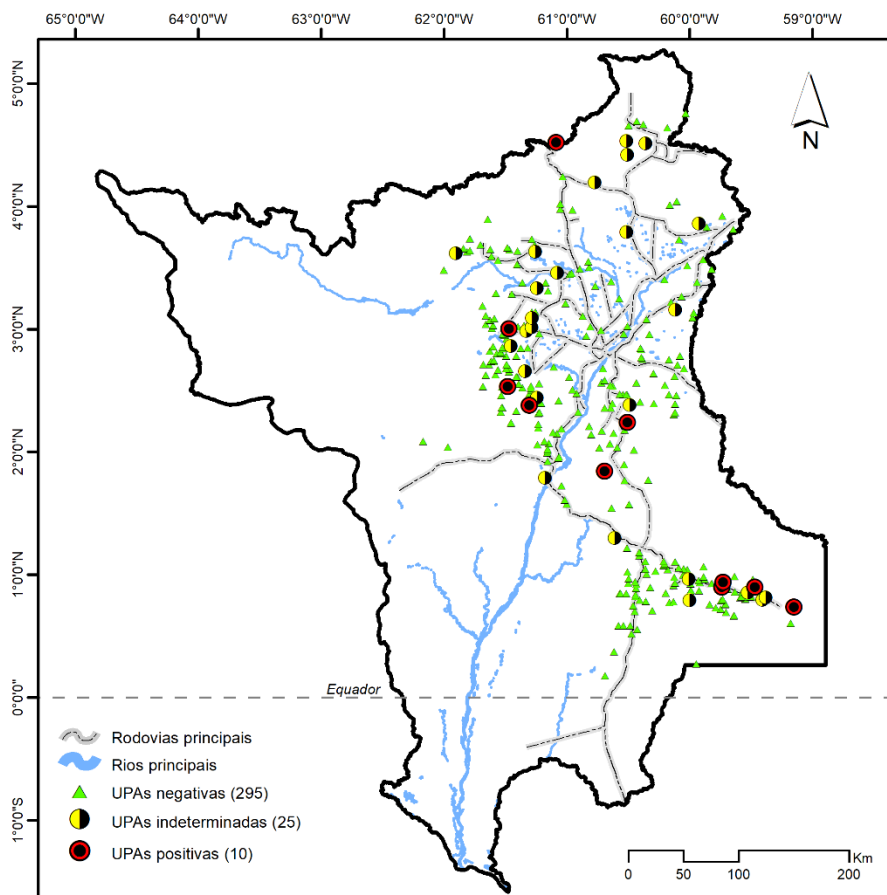


Figura 06. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo na Sub2 (Roraima)

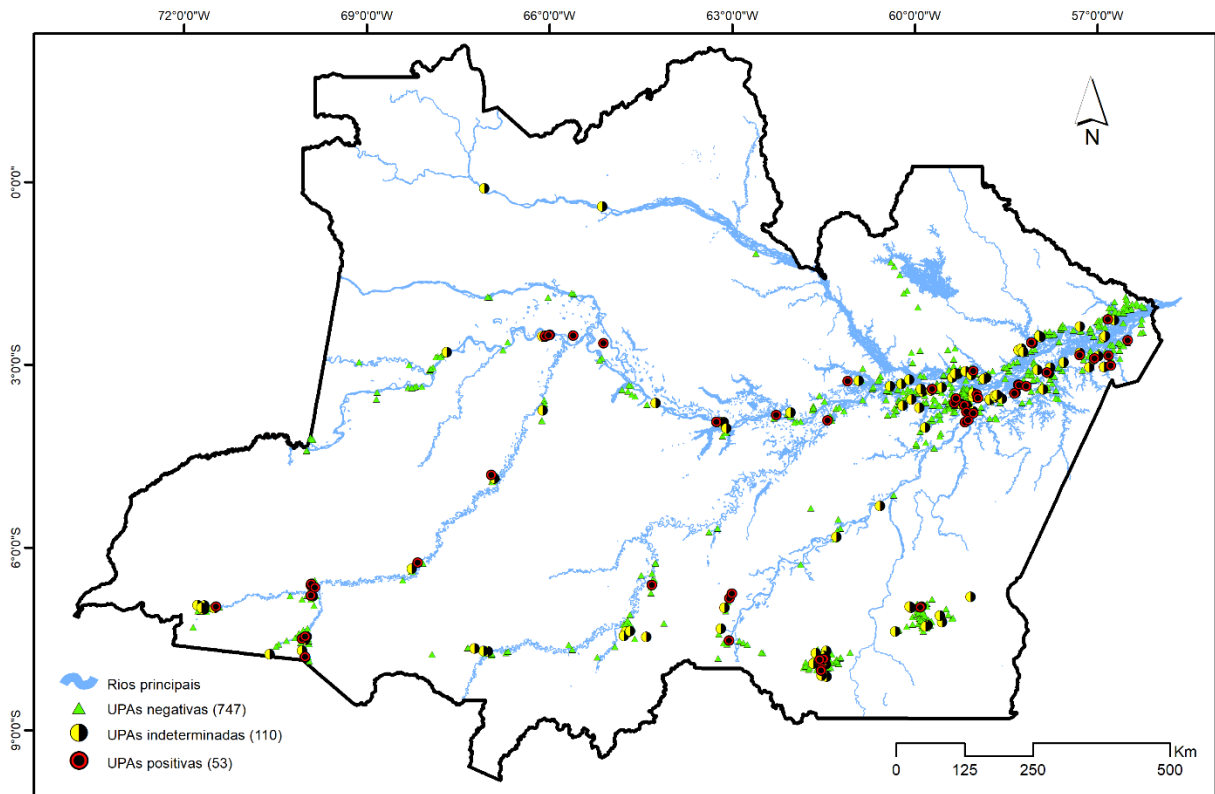


Figura 07. Distribuição geográfica das UPAs que participaram do estudo na Região 3 (Amazonas e Pará)

Tabela 06. Total de UPAs segundo a distância entre o vizinho mais próximo e a classificação com base nos resultados sorológicos da primeira coleta, por subpopulação amostral

Km	Total das UPAs										UPAs positivas ou indeterminadas									
	Sub1		Sub2		Sub3		Sub4		Sub5		Sub1		Sub2		Sub3		Sub4		Sub5	
	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*	UPA	%*
≤ 05	194	64%	173	52%	191	62%	212	71%	243	80%	3	75%	15	43%	40	68%	39	70%	39	81%
05 – 15	92	94%	128	91%	104	95%	64	93%	51	97%	1	100%	15	86%	16	95%	13	93%	7	96%
15 – 25	8	97%	25	99%	9	98%	12	97%	3	98%			2	91%	1	97%	2	96%	0	96%
25 – 50	9	100%	3	100%	2	99%	8	99%	4	99%			3	100%	0	97%	2	100%	2	100%
> 50			1	100%	3	100%	2	100%	2	100%					2	100%				
Total	303		330		309		298		303		4		35		59		56		48	

Estatística	Distância (km)				
	Sub1	Sub2	Sub3	Sub4	Sub5
Mínimo	4*10 ⁻²	1*10 ⁻⁵	6*10 ⁻³	6*10 ⁻²	2*10 ⁻³
1° Quartil	1,9	2,2	1,8	1,0	1,1
Média	5,3	6,5	7,0	5,0	4,0
Mediana	3,6	4,8	3,9	2,2	2,4
Desvio padrão	6,0	6,5	20,3	8,4	7,0
3° Quartil	6,3	8,2	7,3	5,8	4,0
Máximo	49,6	53,4	247,3	65,4	77,8

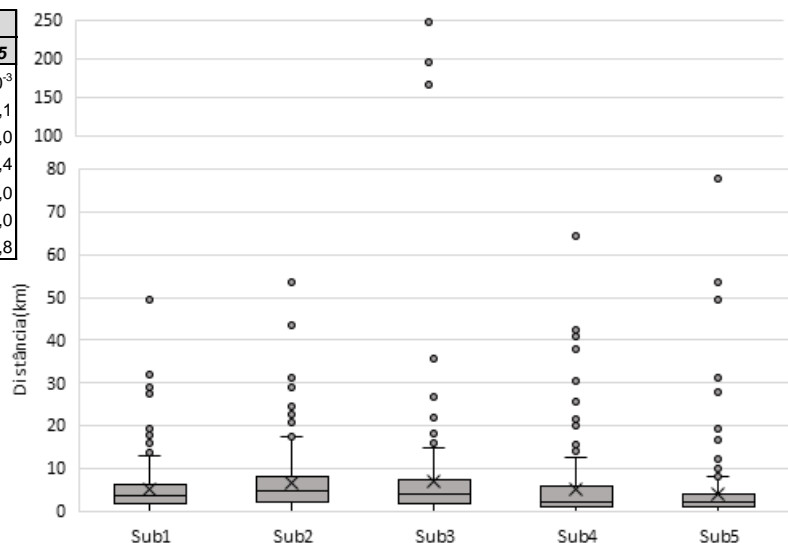


Figura 08. Resultados da análise descritiva das distâncias entre os vizinhos mais próximos, por subpopulação amostral

Os resultados das simulações realizadas utilizando-se a *Função K* estão disponíveis nas Figuras 9 a 11, para as subpopulações 1 e 2 e para o conjunto das subpopulações do AM e do PA, considerando a classificação das UPAs indeterminadas como positivas ou negativas. Como se observa, para todas as subpopulações e cenários considerados, a distribuição das UPAs com bovinos soropositivos ou indeterminados não formou conglomerados como seria esperado no caso de transmissão viral. O agrupamento de UPAs positivas estaria caracterizado caso a estimativa da função $D(s)$, representada pela linha sólida nos gráficos, ultrapassasse o limite superior do gráfico, o que não foi observado nas subpopulações avaliadas. A linha pontilhada nos mapas com a distribuição espacial das UPAs positivas ou indeterminadas, representa uma simplificação da área geográfica considerada na avaliação da formação de conglomerados, eliminando-se as áreas com predominância de florestas.

Para a varredura espacial, os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 7. Considerando o nível de significância de 5%, a análise encontrou um aglomerado de 5 UPAs (p -valor = 0,05) em uma circunferência de raio de 9 km, no Município de Fonte Nova, pertencente à Subpopulação Rio Solimões (Sub4). Das UPAs incluídas neste *cluster*, uma não apresentou animais soropositivos ou indeterminados (AM434) e as demais apresentaram quatro bovinos soropositivos e dois indeterminados de um total de 91 amostras coletadas (UPAs AM435, AM436, AM437 e AM440). Todas essas quatro UPAs foram submetidas à coleta pareada, recuperando-se 89 animais daqueles amostrados na primeira coleta, incluindo todos os animais positivos ou indeterminados. Os quatro bovinos soropositivos e um bovino com resultado indeterminado foram negativos na coleta pareada; e um bovino indeterminado e outro negativo na primeira coleta apresentaram resultados positivos. Dos dois bovinos soropositivos na coleta pareada, um foi submetido a três coletas de LEF, e outro a apenas uma por ter morrido em acidente no campo (atolamento). Todas as amostras de LEF foram negativas pela técnica RT-PCR. Nos exames clínicos realizados não foram identificados sinais clínicos compatíveis com doença vesicular.

Ainda em relação à análise por varredura espacial, considerando o cenário de resultados indeterminados considerados como positivos, deve-se destacar o *cluster* com três UPAs identificado em uma circunferência de raio de 19,4 km no Município de Uiramutã, localizado na Sub2, com p -valor de 0,08. Nestas UPAs foram identificados cinco bovinos com resultados indeterminados do total de 119 animais amostrados. Na coleta pareada, foram recuperados 117 bovinos, incluindo quatro dos cinco bovinos indeterminados na primeira coleta. Todas as amostras da coleta pareada foram negativas aos testes para detecção de PNEs.

As atividades conduzidas durante a investigação complementar descartaram, portanto, a ocorrência de *clusters* de UPAs devido à transmissão viral.

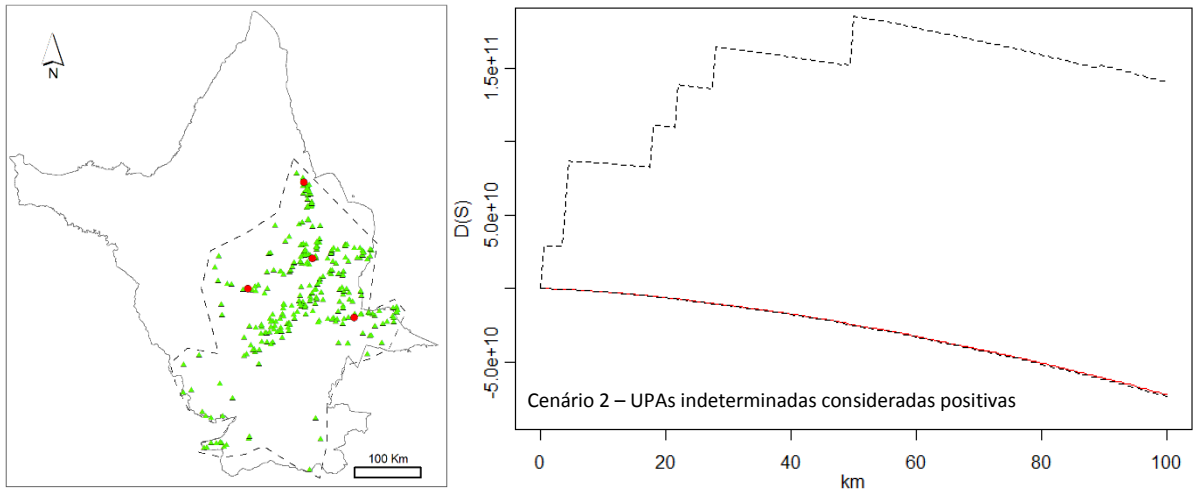


Figura 09. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, Sub1

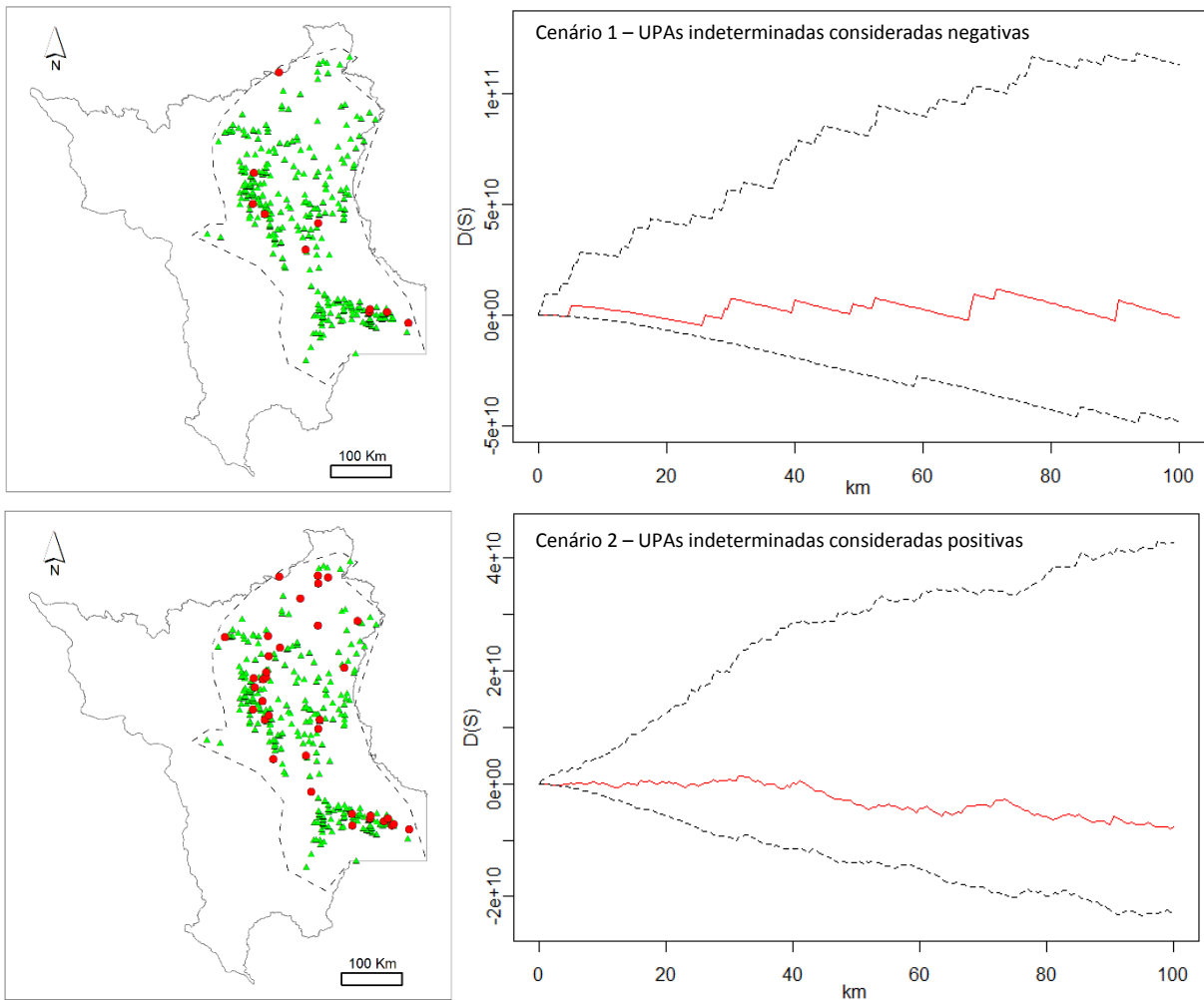


Figura 10. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, Região 2

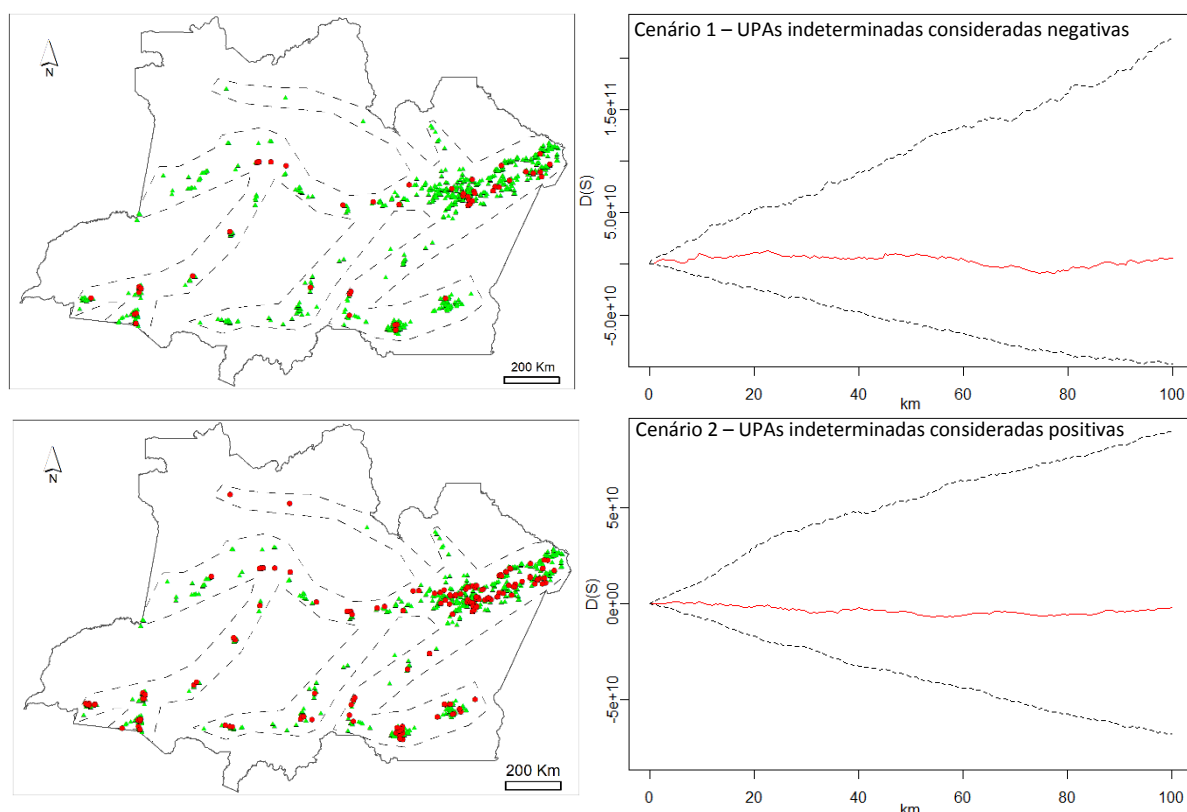


Figura 11. Representação gráfica da análise de distribuição das UPAs por meio da Função K, conjunto das subpopulações do AM e PA

Tabela 07. Resumo dos resultados para varredura espacial, considerando análise puramente espacial, com modelo *Bernoulli*, para *clusters* positivos, nível de significância de 5%, e janela de varredura circular, com raio máximo de 50 km

Subpopulação	Cenário 1 (UPAs positivas)				Cenário 2 (UPAs positivas e indeterminadas)			
	Cluster (ID das UPAs)	Raio (km)	p-valor		Cluster (ID das UPAs)	Raio (km)	p-valor	
Sub1	Sem ocorrência de UPAs positivas				Ausência de <i>Clusters</i>			
	RR174, RR158	4,7	0,18		RR326, RR324, RR328	19,4	0,08	
Sub2	RR186, RR178, RR180, RR187, RR181, RR177, RR176, RR160, RR179	39,7	0,96		RR174, RR158	4,7	0,95	
	RR202, RR203, RR205, RR199, RR200, RR204, RR217, RR234, RR236, RR227	26,3	0,97		RR186, RR178, RR180, RR187, RR181, RR177, RR176, RR160, RR179, RR182, RR183, RR175	43,6	0,96	
	RR129, RR127, RR108, RR106, RR098, RR109, RR128, RR124, RR125, RR126, RR121	24,6	0,98		RR029, RR032, RR045, RR037, RR044, RR036, RR049, RR035, RR043, RR041, RR038, RR042, RR058	27,3	0,98	
	AM435, AM440, AM434, AM437, AM436	9,0	0,05		AM521, AM518, AM513, AM517, AM501, AM515, AM148	15,1	0,20	
Sub3, 4 e 5	AM736, AM737, AM741, AM730, AM156, AM170, AM743	21,7	0,23		AM434, AM437, AM436, AM438, AM439, AM442, AM440, AM443, AM435, AM441	50,0	0,47	
	AM508, AM509	1,3	0,92		AM750, AM748, AM747, AM757, AM190, AM749, AM195, AM200	23,8	0,52	
	AM619, AM637	3,8	0,92		AM366, AM368, AM367	4,0	0,96	
	AM838, AM837	9,4	0,92		AM641, AM640, AM662	9,5	0,96	
	AM389, AM427, AM428	6,0	0,99		AM736, AM737, AM741, AM730, AM156, AM170, AM743, AM738	24,6	0,99	
	AM750, AM748, AM747, AM757, AM190, AM749, AM195, AM200	23,8	0,99					

Informações sobre custos diretos do estudo estão resumidas na Tabela 8, segundo categorias de despesa e UF participante. Na categoria “Planejamento e delineamento” foram consideradas despesas de deslocamento aéreo e diárias para realização, na unidade central do

DSA em Brasília, DF, de duas reuniões técnicas de dois dias com dois representantes dos serviços veterinários estaduais em cada reunião. Os custos relacionados com as atividades de campo limitaram-se a despesas com combustível para deslocamento às propriedades rurais e com materiais utilizados diretamente nas atividades de identificação dos animais amostrados e de coleta, armazenamento e remessa das amostras aos laboratórios do MAPA. Não foram computados custos relacionados com aquisição de equipamentos permanentes, salário dos profissionais envolvidos no trabalho, diárias para realização das atividades de campo, contratação de serviços diversos, despesas com capacitação e treinamento interno dos profissionais, bem como depreciação dos equipamentos utilizados, entre outros custos indiretos envolvidos. De forma geral, a categoria “Planejamento e delineamento” representou 1,5% dos custos totais; a categoria “Atividades de campo”, 71,3%; e os testes laboratoriais, 27,2%. O custo geral apresentou um valor médio global de US\$ 386,26/UPA, revelando valores médios por UPA de US\$ 400,86 no AM; US\$ 346,63 no AP; US\$ 581,35 no PA; e US\$ 233,27 em RR. Em relação aos animais amostrados, o custo direto do estudo revelou um valor médio geral de US\$ 16.51/animal (SD = US\$ 5.56), variando de US\$ 9,73/animal em RR, a US\$ 22,36/animal no PA.

Tabela 08. Custos gerais do estudo, em dólar americano, segundo categoria de despesa e UF

UF	Planejamento e Delineamento	Atividades de campo	Testes laboratoriais	Total
AM	\$1.517,04	\$270.826,01	\$88.034,05	\$360.377,10
AP	\$1.728,21	\$53.944,34	\$24.745,95	\$80.418,51
PA	\$1.445,46	\$47.688,90	\$10.163,13	\$59.297,49
RR	\$4.138,77	\$38.912,75	\$33.926,54	\$76.978,06
Total	\$8.829,49	\$411.371,99	\$156.869,68	\$577.071,16

Considerações finais

Em termos gerais, em todas as subpopulações avaliadas o trabalho cumpriu satisfatoriamente o delineamento proposto, registrando-se quantidade insignificante de descartes de amostras, bem como reduzido número de amostras não coletadas nas atividades complementares. As perdas observadas foram registradas principalmente nas subpopulações dos estados do Amapá e do Amazonas, devido às maiores dificuldades de acesso às propriedades rurais em determinadas fases do estudo e aos sistemas predominantes de criação dos animais, em áreas abertas e de grande extensão geográfica.

Em síntese, os estudos realizados como parte das ações desenvolvidas na região visando a ampliação da zona livre de FA com vacinação, atenderam os objetivos propostos e os resultados obtidos contribuíram para apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da FA, destacando-se os seguintes pontos:

- foi realizada expressiva quantidade de inspeções nos rebanhos das propriedades rurais selecionadas, permitindo o exame clínico de quantidade representativa de animais susceptíveis. Todos os achados clínicos observados pelo serviço veterinário oficial foram registrados e avaliados, e os casos prováveis foram investigados de acordo com protocolo do PNEFA, descartando-se a ocorrência de FA;
- em todas as subpopulações avaliadas foi observada reduzida reatividade para anticorpos contra PNEs, incompatível com situações onde exista transmissão do vírus da FA. Os resultados observados após primeira coleta de amostras de soro sanguíneo foram compatíveis com o nível de especificidade do sistema de diagnóstico utilizado. Como forma de aumentar a segurança do estudo, nas investigações complementares também foram incluídos os resultados indeterminados, sobre os quais não há informações sobre padrão de reatividade publicadas pelos fabricantes ou mesmo na literatura científica. Em adição, as atividades de investigação complementar, incluindo coleta pareada, exames clínicos de boca e de patas e coletas repetidas de LEF para detecção de RNA do vírus da FA, bem como as análises de distribuição espacial das UPAs positivas ou indeterminadas, contribuíram para descartar os resultados soropositivos e indeterminados observados; e
- com apoio do aplicativo *EpiTools epidemiological calculators* (EpiTools, 2014) foram calculados os valores para sensibilidade intrarbanho para as UPAs em cada subpopulação amostral, verificando-se os seguintes valores médios e respectivos desvios padrão: 94,2% (dp 5,2%) na Sub1; 94,3% (dp 4,7%) na Sub2; 94,3% (dp 7,1%) na Sub3; 94,2% (dp 7,5%) na Sub4; 95,4% (dp 6,3%) na Sub5. Com base nestes resultados, a sensibilidade deste componente do sistema de vigilância representou 94,4% na Sub1; 95,6% na Sub2; 94,6% na Sub3; 94,3% na Sub4; e 94,2 % na Sub5. A probabilidade de cada subpopulação amostral estar livre de transmissão do vírus da FA, considerando uma probabilidade a priori conservadora de 20% de infecção, foi de 99% (FAO, 2014).

Independentemente dos resultados satisfatórios observados no estudo, deve-se reconhecer que as condições geográficas predominantes na Região Norte do país, com destaque para AP, AM e partes do PA, impõem severas dificuldades logísticas para realização de estudos transversais, como o presente trabalho. O custo médio por animal amostrado nestes três estados foi de US\$18,77, valor quase duas vezes superior ao registrado em RR (US\$ 9,73/animal), onde as distâncias são menores e a malha viária é mais favorável. O incremento dos custos ocorre, principalmente, nos itens relacionados com o deslocamento às propriedades rurais e com os procedimentos de conservação e remessa de amostras, destacando-se que, enquanto o valor médio das atividades de campo no AP, AM e PA, representou 74% dos custos totais, em RR, esta participação foi de 51%, valor próximo à média registrada no último estudo conduzido na zona livre de FA com vacinação (54%), nos anos de 2014 e 2015. Diante destas dificuldades, é

importante que sejam implantadas atividades de vigilância específicas em áreas remotas da Região Norte do país, com destaque, por exemplo, para capacitação de representantes das comunidades locais, ofertando condições mínimas de estrutura e comunicação, para que possam atuar como sensores do sistema de vigilância para FA e outras doenças dos animais de interesse local e para o país. Ressalta-se, também, a importância do sistema de vigilância local ser fundamento na adequada caracterização de todas as práticas produtivas e comerciais predominantes na região, incluindo a identificação e participação dos principais atores e tomadores de decisão envolvidos (FAO, 2011).

Agradecimentos

Estudos epidemiológicos, como o descrito neste trabalho, somente são possíveis com a participação de número expressivo de profissionais, responsáveis por diferentes atividades de coordenação e execução. Dessa forma, os autores gostariam de reconhecer e agradecer a participação dos profissionais dos serviços veterinários oficiais localizados nos estados envolvidos no trabalho e dos profissionais da rede oficial de laboratórios do Ministério da Agricultura, responsáveis pela realização dos testes laboratoriais.

Referências

ALMEIDA, C.A.; COUTINHO, A.C.; ESQUERDO, J.C.D.M.; ADAMI, M.; VENTURIERI, A.; DINIZ, C.G.; DESSAY, N.; DURIEUX, L. e GOMES, A.R., 2016: High spatial resolution land use and land cover mapping of the Brazilian Legal Amazon in 2008 using Landsat-5/TM and MODIS data. **Acta Amazonica**, Vol 46 (3) p. 291-302.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2008: **Application for restoration of recognition of FMD-free zone with vaccination status**. Report presented to the World Organisation for Animal Health - OIE, requesting the restitution of the recognition of the sanitary status of FMD-free zone with vaccination for the area constituted by the states of Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe and Tocantins. Brasília, DF, April, 49 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2007a: **Instrução Normativa n. 44, de 2 de outubro de 2007**. Aprova as diretrizes gerais para a Erradicação e a Prevenção da FA a serem observados em todo o Território Nacional, com vistas à implementação do Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da FA (PNEFA), conforme o estabelecido pelo Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. D.O.U., 03/10/2007 - Seção 1.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2007b: **Introdução à Estatística Espacial para a Saúde Pública** / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; Simone M. Santos, Wayner V. Souza, organizadores. - Brasília: Ministério da Saúde, 120 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde) (Série Capacitação e Atualização em Geoprocessamento em Saúde; 3)

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2002: **Elimination of the outbreaks of the FMD occurred in the state of Rio Grande do Sul, Brazil**. Report to the FMD and other Epizooties Commission of the Animal World Health Organization – OIE – aiming the restitution of the sanitary condition of the FMD free zone with vaccination for the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Brasília, DF: October, 2002, 199 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal (1983). **Plano de controle e erradicação da febre aftosa – PNCFSA**: Segunda etapa – 1983/1987. Brasília: Ministério da Agricultura.

CAMERON, A. R. e F. BALDOCK, C., 1998: Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine** 34, 19-30.

CUZICK, J. e EDWARDS, R., 1990: Spatial clustering for inhomogeneous populations. **J. Royal Statistical Society B** 52, p. 73-104.

DOHOO, I., MARTIN, W. e STRYHN, H., 2010: **Veterinary epidemiologic research**. National Library of Canada Cataloguing in Publication, 2 ed. ISBN 978-0-919013-60-5.

DORA, J. F. P. e PETRY, M. C., 1984: Importância epidemiológica das espécies animais em FA. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre, v. 3, n. 17, p. 53-59.

EPITOOLS, 2014: Website (available at <http://epitools.ausvet.com.au/>)

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014: **Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease**. FAO Animal Production and Health Manual n. 17. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-108637-7. 199 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2011: **A value chain approach to animal diseases risk management – Technical foundations and practical framework for field application**. Animal Production and Health Guidelines n. 4. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-106861-8. 140 p.

GORIS, N., PRAET, N., SAMMIN, D., YADIN, H., PATON, D., BROCCHI, E., BERVENS, D. e DE CLERCQ, K., 2007: Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELSIA tests and true prevalence in the field. **Vaccine**, 25, p. 7177-7196.

GREINER, M. e DEKKER A., 2005. On the surveillance for animal diseases in small herds. **Preventive Veterinary Medicine** 70, 223–234. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.03.007

KULLDORFF, M., 1997: A spatial scan statistic. **Communications in Statistics, Theory and Methods** 26, p. 1481-1496.

MARTIN, S. W., SHOUKRI, M. e THORBURN, M. A., 1992: Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, 14, 33-43. doi:10.1016/0167-5877(92)90082-Q

NARANJO, J. e O. COSIVI, 2013: Eradication of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. **Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.** 368, 20120381. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0381>

NEGREIROS, R. L., AMAKU, M., DIAS, R. A., FERREIRA, F., CAVALLÉRO, J. C. M. e FERREIRO NETO, J. S., 2009: Spatial clustering analysis of the foot-and-mouth disease outbreaks in Mato Grosso do Sul state, Brazil – 2005. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p. 2609-2613.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016a: **Terrestrial Animal Health Code**. Acessado em dezembro de 2016, de www.oie.int.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016b: **List of FMD free Member Countries**. Acessado em dezembro de 2016, de www.oie.int.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2016c: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus), Chapter 2.1.8. Paris, France, 31 p. (NB: Version adopted in May 2012).

OIE (World Organisation for Animal Health), 2014: **Guide to terrestrial animal health surveillance**. ISBN 978-92-9044-842-6. 108 pp.

OLASCOAGA, R.C.; GOMES I.; ROSENBERG, F.J.; MELLO, P. A.; ASTUDILLO. V. e MAGALLANES N., 1999: **Fiebre Aftosa**. São Paulo: Editora Atheneu, 458 p.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2016: **Informe de situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa**. Sudamérica y Panamá, año de 2015. PANAFOTSA – OPS/OMS. 144 p.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2015: **Guia Técnica de Trabajo para la Última Etapa del Programa Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa - PHEFA**. PANAFOTSA – OPS/OMS. 50 p.

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012a: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa Prueba Confirmatoria, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA, (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012b: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa, Prueba Tamiz, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2011: **Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease – PHEFA, Action Plan 2011-2020**. Approved Document – 15-12-2010. 46 p. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/PHEFA-PlanAccion-2011-2020ing.pdf>

PATON, D.J., DE CLERCQ, K. e DEKKER, A., 2004: **Post-vaccinal Serosurveillance for FMD: A European Perspective on Progress and Problems**, <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App76.pdf>.

REVISÃO da política e estratégias de combate à FA implantadas pelo Projeto de Controle das Doenças dos Animais, 1992. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. 34 p.

RIPLEY, B. D., 1977: Modelling spatial patterns (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, v.39, p.172-212.

ROWLINGSON, B. S. e DIGGLE, P. J. SPLANCS, 1993: spatial point pattern analysis code in S-Plus. **Computers and Geosciences**, v.19, p.627-655.

SARAIVA V. e GEALE D., 2008: **The Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease [Plan Hemiférico de Erradicación de Fiebre Aftosa (PHEFA)]: Successes and Challenges**. In: The Global control of FMD - Tools, ideas and ideals. Rome: FAO. Appendix 6

SERGEANT, E. S. G., 2015: **Epitools epidemiological calculators**. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.

ZILLER, M., SELHORST, T., TEUFFERT, J., KRAMER, M. e SCHLÜTER, H., 2002: Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. **Preventive Veterinary Medicine** 52, 333–343.

Capítulo 6

ESTUDO DE REPETIBILIDADE DE TESTE ELISA 3ABC EM LABORATÓRIOS DA REDE OFICIAL NO BRASIL

Resumo

O estudo de repetibilidade foi conduzido em dois laboratórios oficiais, denominados como Lab1 e Lab2, envolvendo ensaio ELISA 3ABC e 4.319 amostras sorológicas de campo oriundas de estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão do vírus da febre aftosa. As amostras foram coletadas em bovinos de 6 a 24 meses de idade, pertencentes a rebanhos submetidos à vacinação sistemática contra a doença. A análise dos resultados envolveu uma abordagem quantitativa, considerando o percentual de inibição (PIn) elaborado a partir das leituras de densidade ótica das amostras, e uma abordagem para os dados discretos, com base na classificação dos resultados de cada amostra como positiva ou negativa, a partir do ponto de corte definido para a prova ($PIn \geq 50\%$). Para análise dos resultados expressos em PIn foi utilizado o coeficiente de correlação de concordância (CCC) e avaliado os limites de concordância por meio de gráfico de Bland-Altman. Os resultados dicotômicos foram avaliados por meio de coeficiente kappa (CK), utilizando teste de Gwet (AC_1). Referido coeficiente foi acompanhado de estatísticas de apoio como: proporção de concordância positiva e negativa e índice de prevalência. Os valores de CCC apontaram para uma concordância moderada nos dois laboratórios, com resultados de 0.49 (IC95%: 0.46 a 0.52) no Lab1, e de 0.53 (IC95%: 0.50 a 0.57) no Lab2. Por meio do gráfico de Bland-Altman foi possível identificar grande dispersão dos resultados em torno da média, enquanto a diferença entre os testes (entendida como viés) revelou distanciamento médio significativo em relação a zero, igual a 6,0% (IC95%: 5.5 a 6.5) no Lab1 e igual a 4,4% (IC95%: 3.9 a 4.9) no Lab2. Os resultados de AC_1 , por sua vez, revelaram alto nível de concordância entre os testes realizados, com valores de 97,7% (IC95%: 97,0% a 98,3%) para o LAB1 e 98,5% (IC95%: 98,0% a 99,0%) para o LAB2. Apesar das abordagens mostrarem-se divergentes, na realidade devem ser entendidas como complementares, e o estudo aponta para importância de serem apresentadas em conjunto. Como o banco de amostras avaliado apresenta alto percentual de resultados negativos, a diferença dos valores de PIn observada entre os testes, em sua maior parte, não alterou a classificação final das amostras, permitindo valores expressivos no teste AC_1 . O reflexo dessa variabilidade ficou claro com os menores resultados de AC_1 envolvendo amostras com valores de PIn próximos ao ponto de corte considerado. Caso a abordagem ficasse restrita ao coeficiente *kappa*, a importante variabilidade observada nos resultados de PIn não seria percebida. Essa variabilidade deve ser considerada, buscando-se melhor controle e conhecimento das causas envolvidas. Independente da variabilidade observada nos valores de PIn, os resultados obtidos no presente estudo, particularmente no método AC_1 , contribuem para demonstrar boa confiança para os estudos epidemiológicos conduzidos com objetivo de apoiar a certificação de ausência de transmissão do vírus da FA em zonas livres com vacinação.

Palavras-chave: FMD; DIVA testes; Gwet, coeficiente kappa, concordância

Introdução

A partir de meados dos anos 1990, considerando o objetivo de implantação gradativa de zonas livres da febre aftosa (FA), foram realizados vários estudos para avaliação de transmissão viral no Brasil, com base no conceito de zonificação incorporado ao Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, a partir de sua sexta edição, publicada em 1992 (OIE, 1992). No período de 1995 a 2015, foram realizados 38 estudos em diferentes localidades do país, cujo delineamento considerou particularidades geográficas e agroprodutivas de cada região, tendo em comum a utilização de testes sorológicos para identificação de anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA, os denominados testes DIVA - *Differentiation of Infected from Vaccinated Animals* (UTTENTHAL et al., 2010).

Na América do Sul, na década de 1980 e início dos anos 1990, os estudos foram baseados na detecção de antígeno associado à infecção viral (VIAA) por meio de teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA), conforme descrito por Alonso e Söndahl (1975) e PANAFTOSA (1980). Entretanto, problemas de reprodutibilidade do teste, bem como a constatação de indução de anticorpos contra VIAA em bovinos vacinados contra a FA (Alonso et al., 1988 e 1990; Bergman et al., 1998), estimularam, a partir da década de 1990, o desenvolvimento pelo Centro Pan-americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) de um sistema de diagnóstico de melhor sensibilidade e especificidade. Esse sistema envolve a combinação de dois ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA: um teste de triagem, representado por um ELISA indireto (*Indirect – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos contra o antígeno 3ABC, seguido de um teste confirmatório, representado pela técnica EITB (*Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot*) para detecção de anticorpos contra as proteínas antigênicas 3ABC, 3D, 2C, 3B e 3A (BERGMANN et al., 1993, 1996, 2000, 2003a; BERGMANN e MARILAT, 1995; PANAFTOSA, 2000). Desde então, este sistema de diagnóstico tem apoiado os estudos epidemiológicos para avaliação da transmissão viral nos países da América do Sul (BERGMANN et al., 2003b; GONÇALVES et al. 2003). No Brasil, diante da grande demanda por testes DIVA para FA, a partir de 2012, tem-se alternado o uso do teste ELISA 3ABC fabricado pelo PANAFTOSA com outros desenvolvidos por distintos laboratórios. Para estes testes, os níveis de sensibilidade e especificidade de diagnóstico têm sido avaliados e publicados em diferentes trabalhos, como Brocchi et al. (2006) e Goris et al. (2007).

A certificação da condição zoossanitária apoiada na realização de estudos epidemiológicos, como os utilizados para avaliação de transmissão do vírus da FA, tem grande importância para o comércio nacional e internacional. Geralmente, estes estudos envolvem grandes populações animais e, conseqüentemente, grande quantidade de amostras, de forma que estimar os níveis de repetibilidade dos ensaios utilizados contribui para avaliar o nível de confiança sobre os resultados obtidos. Neste contexto, considerando a frequência e importância dos estudos epidemiológicos para FA no país, o presente trabalho, inserido nos programas de gestão interna de qualidade dos laboratórios oficiais, buscou avaliar o grau de repetibilidade de resultados do teste ELISA 3ABC utilizado nos últimos estudos de transmissão do vírus da FA conduzidos no país.

Material e métodos

Estudo de repetibilidade, segundo o Manual das Provas de Diagnóstico e das Vacinas para os Animais Terrestres da OIE – Manual Terrestre (OIE, 2016), refere-se à avaliação do nível de coincidência ou concordância de resultados entre réplicas de uma amostra. Busca-se, portanto, avaliar a variabilidade entre resultados de repetidos testes da mesma amostra dentro do mesmo laboratório (BARNHAR et al., 2007; DOHOO et al., 2010), pressupondo, dessa forma, que as condições entre as medições são as mesmas (laboratório, equipamentos, profissionais e método analítico).

Neste estudo, nenhum dos testes foi considerado como padrão ou de referência, destacando-se que, apesar de se utilizar o mesmo método analítico (ELISA 3ABC) produzido por um mesmo fabricante, foram utilizados kits de lotes diferentes, o que pode ser um elemento de variação não avaliado neste estudo. Independente desta variável, que se revela intrínseca a todos os testes laboratoriais, espera-se, obrigatoriamente, altos níveis de repetibilidade para a mesma amostra.

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de campo oriundas de dois estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão do vírus da FA conduzidos no país, nos anos de 2014 e 2015, em áreas submetidas a regime de vacinação sistemática e massiva contra a doença. O banco de soros dos referidos estudos está constituído por 65.964 amostras, armazenadas a -20°C. As amostras foram coletadas de bovinos entre 6 e 24 meses de idade, e o sistema de diagnóstico laboratorial utilizado foi o ELISA 3ABC, como teste de triagem, e o EITB, como teste confirmatório. Os testes laboratoriais foram realizados no período de setembro de 2014 a setembro de 2015. Para o teste de triagem (ELISA 3ABC), considerado no presente trabalho, o percentual geral de amostras positivas foi de 1,5%, consistente com a expectativa de falsos positivos indicada por Goris et al. (2007).

O estudo foi realizado em dois laboratórios da rede oficial do Brasil, aqui identificados como Lab1 e Lab2. O tempo médio para repetição dos testes foi de 16,8 meses (variando de 10,9 a 19,1 meses) no Lab1, e de 18,2 meses (variando de 14,9 a 20,3 meses) no Lab2. A princípio, o longo tempo entre repetições não foi entendido como fator limitante, considerando que, em amostras de soro adequadamente conservadas, e não submetidas a repetidos procedimentos de descongelamento e congelamento, espera-se que o tempo de vida de anticorpos e outras proteínas ultrapasse vários anos (JOHNSON, 2012; ARGENTIERI et al., 2013).

Características do ensaio analítico avaliado

O ensaio analítico utilizado foi um teste ELISA de bloqueio, indireto, para detecção de anticorpos monoclonais específicos contra a proteína não-estrutural 3ABC do vírus da FA. Os testes laboratoriais foram executados de acordo com orientações do fabricante e utilizando método acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), conforme a ISO 17025. As amostras avaliadas são classificadas em duas categoriais, *positivas* ou *negativas*, considerando a leitura das densidades óticas a 450 nm (DO_{450}). Os valores de DO_{450} de todas as amostras são expressos como porcentagem de inibição (PIn) em relação à DO_{450} média do controle negativo (denominada DO_{max}), de acordo com a seguinte fórmula: $PIn = 100 - (DO_{450} \text{ da amostra teste} / DO_{max}) \times 100$. Amostras são consideradas positivas quando $PIn \geq 50\%$. Segundo Goris et al. (2007), os valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica do teste, para amostras de bovinos, foram, respectivamente, 92,5% (IC95%: 86,3 – 97,4) e 97,8% (IC95%: 95,9 – 99,2).

Análise estatística

O estudo envolveu uma abordagem quantitativa, baseada nos valores de PIn, e uma avaliação de concordância com base nos resultados discretos.

A análise dos resultados expressos em PIn, envolveu a avaliação de medidas de variabilidade dos resultados obtidos em cada teste e em cada laboratório, conforme recomendações da OIE (2016). Para avaliação, foi utilizado o coeficiente de correlação de concordância (CCC), proposto por Lin (1989), e discutido por diferentes autores (BARNHAR et al., 2007; BARTLETT e FROST, 2008; DOHOO et al., 2010; WATSON e PETRIE, 2010). O CCC permite avaliar o grau em que dois pares de observações caem em uma linha de 45° desde a origem, ou seja, mede o quão distante cada observação se encontra da linha de melhor ajuste. A magnitude dos valores de CCC varia entre -1 a 1, sendo 1 concordância máxima, -1, discordância máxima. Segundo escala proposta por Granero (2009), valores de CCC entre 0.21 e 0.40 caracterizam concordância básica; entre 0.41 e 0.60, moderada; entre 0.61 e 0.80, substancial; e $\geq 0,81$, quase perfeita. Entretanto, trata-se de escala sugestiva, não devendo ser utilizada de forma genérica e definitiva.

Em complemento ao CCC, foi utilizada a metodologia proposta por Bland e Altman (1986, 1999, 2007) para avaliar os limites de concordância por meio da elaboração de gráfico de dispersão entre a diferença e a média dos resultados obtidos entre cada teste. Neste gráfico é possível visualizar o viés (o quanto as diferenças se afastam do valor zero) e o erro aleatório (a dispersão dos pontos das diferenças ao redor da média), além de *outliers* e tendências (HIRAKATA e CAMEY, 2009; DOHOO et al., 2010). O cálculo de CCC e a elaboração do gráfico para avaliação dos limites de concordância (gráfico Bland-Altman) foram implementados no programa Microsoft® Excel® 2016.

No caso de variáveis dicotômicas, segundo Vieira e Garrett (2005), a maneira mais simples e intuitiva de organizar os dados para avaliação é por meio de uma tabela de contingência 2x2, conforme Figura 1, que mostra, como no presente caso, a relação entre dois resultados de um mesmo teste realizado por um mesmo avaliador, no formato de frequências (quadro “a”) ou de proporções (quadro “b”). Para avaliação de concordância com os resultados discretos, a estatística mais amplamente utilizada é o coeficiente kappa (CK), que busca inserir a chance como parte da explicação da concordância observada, ou concordância bruta. De acordo com Sim e Wright (2005), o CK trata-se de uma medida de concordância verdadeira, ou seja, concordância além do esperado pela chance. Em síntese, seu cálculo, fórmula (1) Figura 1, envolve a razão entre a concordância observada (P_o), fórmula (2), e a concordância perfeita (= 1), excluída, de ambas, a concordância devido à chance (P_c), fórmulas (3) e (4). Para sua realização, as seguintes condições são necessárias: unidades avaliadas devem ser independentes; categorias da escala nominal devem ser mutuamente excludentes; e testes ou “avaliadores” devem operar de forma independente (COHEN, 1960). O CK pode variar entre $-P_c/(1-P_c)$ e 1, onde 1 expressa concordância perfeita, zero concordância igual ao esperado pela chance, e valores negativos, concordância pior do que aquela esperada pela chance (Shankar e Bangdiwala, 2014). Existem propostas de escalas para classificação dos valores do CK, mas são medidas arbitrárias que revelam pouco valor científico, não devendo ser utilizadas de forma genérica, conforme afirma Komagata (2002).

A estatística P_o representa o total de resultados concordantes, positivos e negativos, em relação ao total de resultados obtidos, sendo considerada incompleta e, às vezes, enganosa, uma vez que não considera a possibilidade de parte dos resultados concordantes terem sido devido à chance. O elemento de maior complexidade no cálculo do CK trata-se, portanto, da estimativa de P_c , calculada utilizando-se, basicamente, os totais marginais da tabela de contingência, considerando duas abordagens principais: distribuição das categorias igual ou diferente para cada avaliador/teste. De acordo com o cálculo de P_c , diferentes metodologias foram propostas,

constituindo, conforme definido por Powers (2012), a denominada “família” dos testes *kappa*, cujo representante mais conhecido e amplamente utilizado é o teste *kappa* de Cohen (COHEN, 1960), onde a estimativa de P_c é calculada conforme fórmula (3). Entretanto, segundo Cicchetti (1988), Feinstein e Cicchetti (1990) e Sim e Wright (2005), o teste *kappa* de Cohen é fortemente afetado por fatores como prevalência e viés, produzindo, o que os autores denominaram como os dois paradoxos (ou contradições) de *kappa*: paradoxo 1, presença de baixo CK frente a alto valor de concordância bruta (principalmente quando os valores de prevalência aproximam-se dos extremos, 0% ou 100%); e, paradoxo 2, tabelas de contingência assimétricas e imperfeitamente desbalanceadas produzem CK maior do que tabelas simétricas e perfeitamente desbalanceadas (principalmente devido a problemas de viés). As questões relativas aos paradoxos de *kappa* são discutidas por diferentes autores com destaque para Byrt et al. (1993), Di Eugenio e Michael (2004), Sim e Wright (2005) e Shankar e Bangdiwala (2014).

Considerando que no presente estudo, o banco de soros utilizado caracteriza-se por uma baixa prevalência de resultados positivos (na realidade, falsos positivos) ao teste ELISA 3ABC (1,5%), para evitar o paradoxo 1 de *kappa*, o cálculo do CK foi realizado com a metodologia proposta por Gwet (2008), que utiliza uma probabilidade devido à chance (P_c), fórmula (4), calibrada para ser consistente com a tendência das classificações aleatórias sugeridas pelas classificações observadas. O autor refere-se à estatística calibrada como estimador AC_1 , onde AC significa *Agreement Coefficient* e o dígito 1 indica correção da chance de primeira ordem. Segundo Shankar e Bangdiwala (2014), AC_1 é semelhante ao CK de Cohen, exceto por um ajustamento realizado no cálculo de P_c , usando a média das probabilidades marginais para cada categoria. Com objetivo de comparar o uso das diferentes propostas de cálculo do CK, Xie (2013) e Wongpakaran et al. (2013) realizaram simulações empregando dados com diferentes distribuições marginais, concluindo que o coeficiente AC_1 apresenta-se como melhor alternativa ao amplamente utilizado *Kappa* de Cohen.

Independente das diferenças conceituais no cálculo de P_c , há consenso quanto ao entendimento de que uma única estatística não é suficiente para compreensão adequada nos estudos de concordância (FEINSTEINT e CICCHETTI, 1990; CICCHETTI e FEINSTEINT, 1990). Segundo os autores, não importa como o CK seja construído, a distinção sobre interpretações positivas ou negativas, entre outros detalhamentos, será perdida quando toda informação é resumida em um único índice geral. Rogot e Goldberg (1966) reforçam que não há índice perfeito para resumir qualquer massa de dados e que, quando tabelas 2x2 são representadas por apenas uma estatística, informação é perdida. Para resolver esta limitação,

diferentes autores (CICCHETTI e FEINSTEINT, 1990; BYRT et al., 1993; DI EUGENIO e MICHAEL, 2004; CUNNINGHAM, 2009) recomendam a publicação de estatísticas complementares, como: proporção de concordância positiva e proporção de concordância negativa, P_{pos} e P_{neg} , fórmulas (5) e (6); índice de prevalência, PI, fórmula (7); e índice de viés ou bias, BI, fórmula (8). Essas estatísticas ajudam a compreender a distribuição dos dados, especialmente o balanço e equilíbrio dos totais marginais da tabela de contingência, questão que influencia diretamente na magnitude dos valores de P_c e, conseqüentemente, do CK. Em complemento, na Figura 1 também está incluída representação matemática demonstrada por Xie (2013) para o cálculo de AC_1 , fórmula (9), substituindo-se o valor de P_c pelo valor de PI, permitindo uma melhor compreensão conceitual desta estatística.

Toda a análise dos valores de AC_1 , assim como as fórmulas descritas na Figura 1 foram implementadas no software Microsoft® Excel® 2016. Especificamente para cálculo dos intervalos de confiança para AC_1 , foi utilizado script elaborado por Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil (trabalho não publicado), para a plataforma R, disponível no endereço eletrônico <http://www.mail-archive.com/r-sig-epi@r-project.org/msg00037.html>. Outras abordagens para análise de concordância entre variáveis discretas, que envolvem procedimentos matemáticos mais complexos estão disponíveis nos trabalhos de Ato et al. (2011), Powers (2012), Shankar e Bangdiwala (2014) e Kirilenko e Stepchenkova (2016).

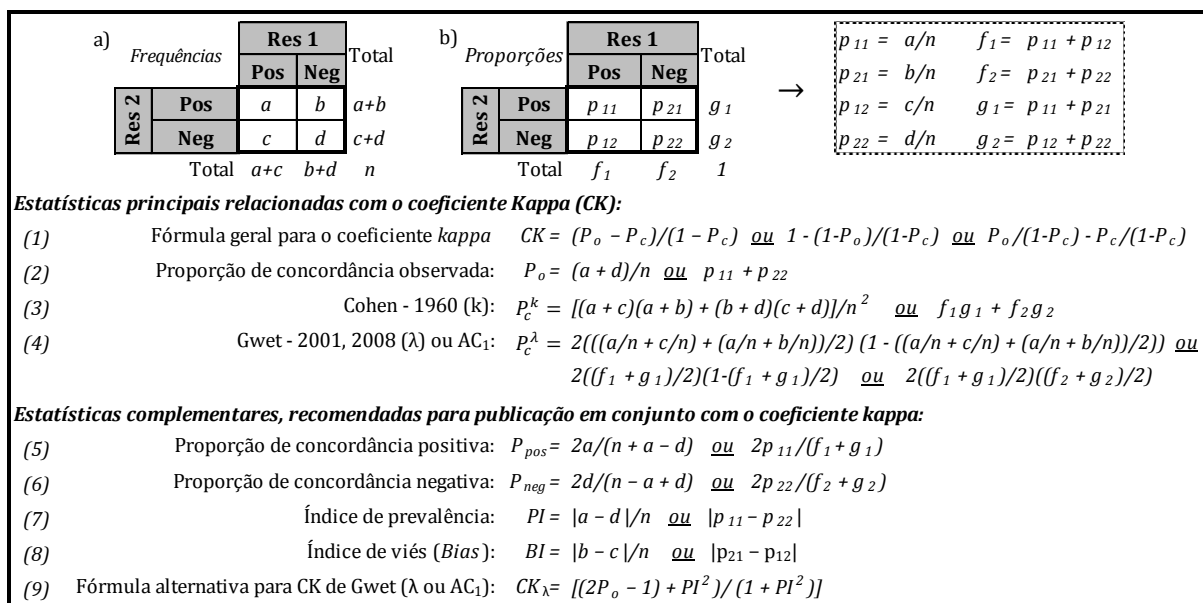


Figura 01. Forma de organização dos dados e representação matemática das estatísticas de concordância para resultados dicotômicos, considerando dois avaliadores ou testes e duas categorias de classificação

Delineamento amostral

Para cada laboratório foi realizado um estudo independente, com tamanho da amostra definido de acordo com Lee (2002), baseando-se na estimativa das proporções da tabela de contingência: p_{11} (proporção estimada de positivos), g_1 e f_1 (proporção esperada de resultados positivos nos dois testes). Para o presente estudo foram utilizados os valores de 0,01 para p_{11} ; 0,06 para g_1 e f_1 ; empregando-se os valores de 0,95 para α (erro Tipo I) e 0,90 para β (erro Tipo II). Os cálculos levaram à definição do total de 2160 amostras por laboratório, após acréscimo de 10% de segurança e adequação ao número de 90 amostras por placa (24 placas por laboratório). O banco de dados das amostras foi ordenado sequencialmente segundo código da propriedade, município e UF de localização dos animais, utilizando-se amostragem sistemática simples para seleção das amostras em cada laboratório.

Resumo do delineamento amostral está disponível na Figura 2. Um total de amostras (n_1) foi selecionado aleatoriamente em cada laboratório para repetição do teste ELISA 3ABC. As análises quantitativas (CCC e gráfico Bland-Altman) e discretas (AC_1 e estatísticas complementares) foram realizadas utilizando-se os resultados dos dois testes obtidos em cada amostra selecionada. Especificamente para a análise dos resultados dicotômicos, os resultados das amostras selecionadas foram organizados para constituir subgrupos amostrais para avaliação do grau de repetibilidade relacionado à proximidade dos resultados ao ponto de corte utilizado e ao histórico de vacinações dos animais contra a FA. Dessa forma, em cada laboratório, foram constituídos os seguintes subgrupos: *Subgrupo 1 (Sub1)*, amostras com PIn em torno de um desvio padrão acima e abaixo do ponto de corte utilizado, referente à distribuição dos valores PIn obtidos no primeiro teste (n_2); *Subgrupo 2 (Sub2)*, amostras com PIn acima ou abaixo dos limites de um desvio padrão em torno do ponto de corte utilizado, referente à distribuição dos valores PIn obtidos no primeiro teste ($n_3 = n_1 - n_2$); *Subgrupo 3 (Sub3)*, bovinos nascidos nas propriedades, não vacinados ou com histórico de até uma vacinação contra a FA (n_4); e *Subgrupo 4 (Sub4)*, bovinos nascidos nas propriedades e com histórico de duas ou mais vacinações contra a FA (n_5). Dessa forma, os subgrupos Sub1 e Sub2 foram constituídos com objetivo de avaliar se possíveis discordâncias estão concentradas nas proximidades do ponto de corte utilizado ($PI \geq 50\%$), e os subgrupos Sub3 e Sub4, com objetivo de avaliar se existe relação entre grau de concordância dos resultados e histórico de vacinação dos animais. Os subgrupos Sub1 e Sub2, são excludentes e o somatório de n_2 e n_3 é igual a n_1 . Os subgrupos Sub3 e Sub4 também são excludentes, mas o somatório de n_4 e n_5 é inferior a n_1 , uma vez que foram consideradas apenas amostras oriundas de bovinos nascidos nas propriedades, de forma a permitir maior confiabilidade quanto ao histórico de vacinações contra a FA.

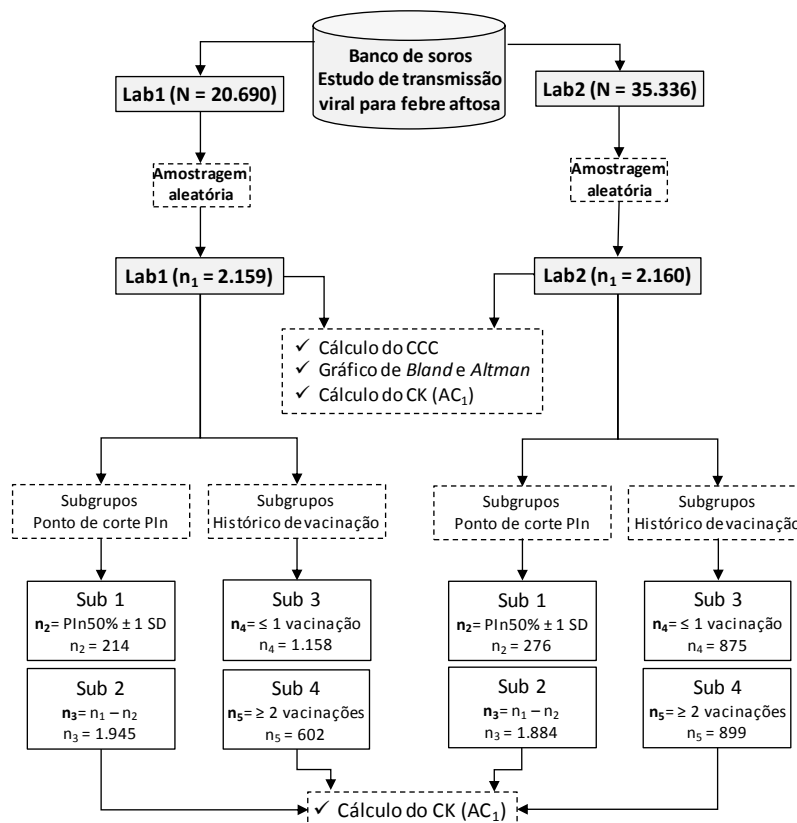


Figura 02. Representação esquemática do delineamento amostral do estudo

Resultados e discussão

Em termos gerais, os resultados positivos do primeiro e segundo ensaios ficaram dentro dos limites de especificidade do teste avaliado, observando-se redução do número de amostras positivas nos dois laboratórios. Com nível de confiança de 95%, a redução foi significativa no Lab1 ($X^2 = 22,8$; p-valor $< 0,00001$), passando de 58 amostras positivas (2,69%) para 17 (0,79%), e não significativa no Lab2 ($X^2 = 1,74$; p-valor = 0,083), com redução do número de amostras positivas de 40 (1,85%) para 26 (1,26%). Esta redução dos resultados positivos, especialmente no Lab1, deve ser avaliada no âmbito interno do laboratório, com especial atenção para os procedimentos de conservação das amostras. Os resultados referentes à análise de variabilidade dos valores PIn e dos dados discretos são apresentados na sequência.

Análise dos valores PIn

Representações gráficas das distribuições dos valores de PIn obtidos em cada laboratório e teste realizado estão disponíveis nas Figuras 3 e 4, demonstrando Distribuição Normal dos dados. Observa-se a presença de valores discrepantes (*outliers*) que, considerando o conjunto de testes por laboratório, representaram 3,5% (151/4318) dos dados no Lab1, e 2,7% (116/4320) no Lab2. Em ambos os laboratórios foi observada redução significativa do valor médio de PIn no segundo teste em relação ao primeiro (valor-p $< 0,001$). Os resultados do segundo teste também revelaram, nos dois laboratórios, maiores valores para o coeficiente de variação (CV), com maior evidência no Lab1.

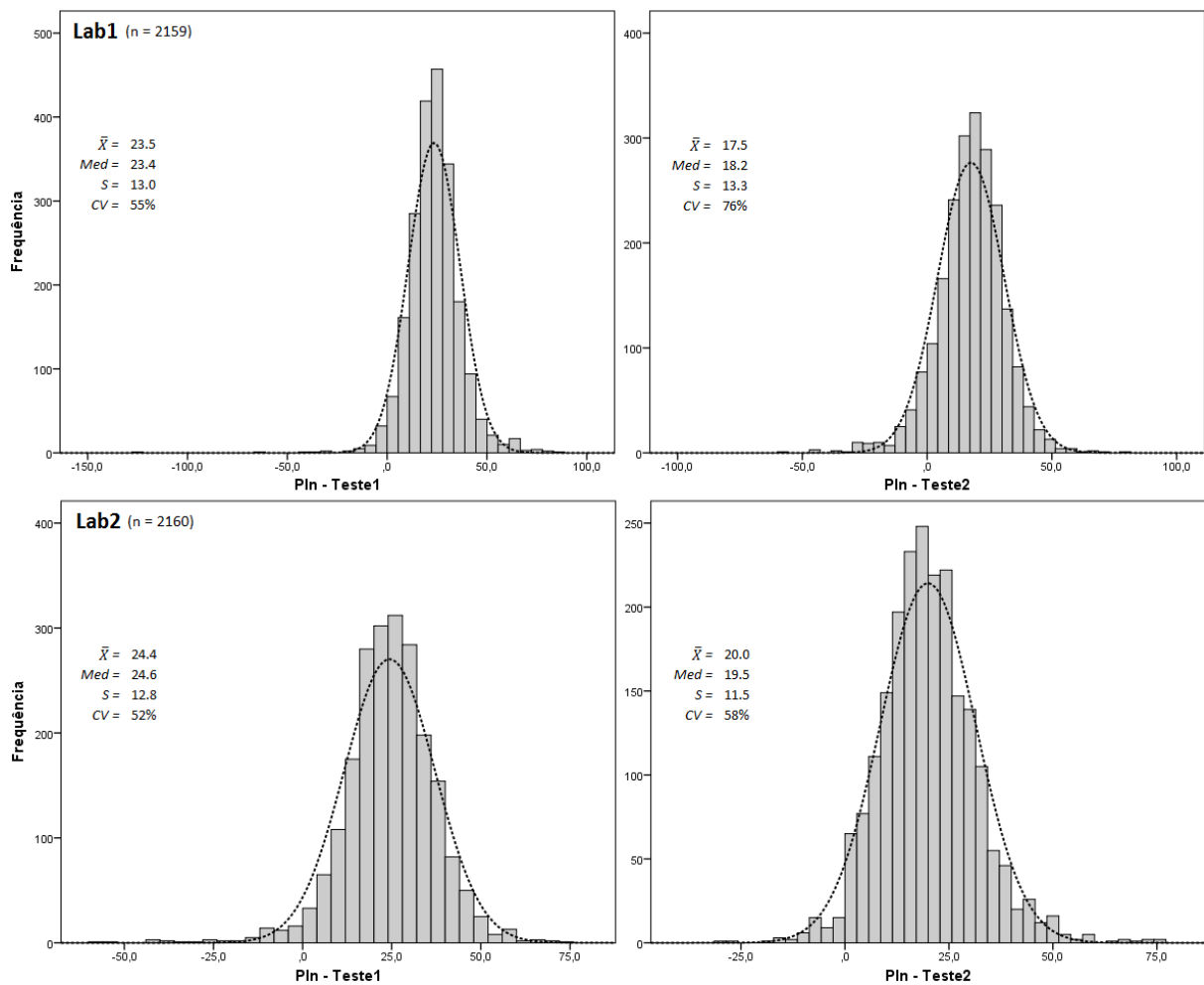


Figura 03. Histogramas referentes aos percentuais de inibição (PIn) do ELISA 3ABC, segundo laboratório e teste realizado

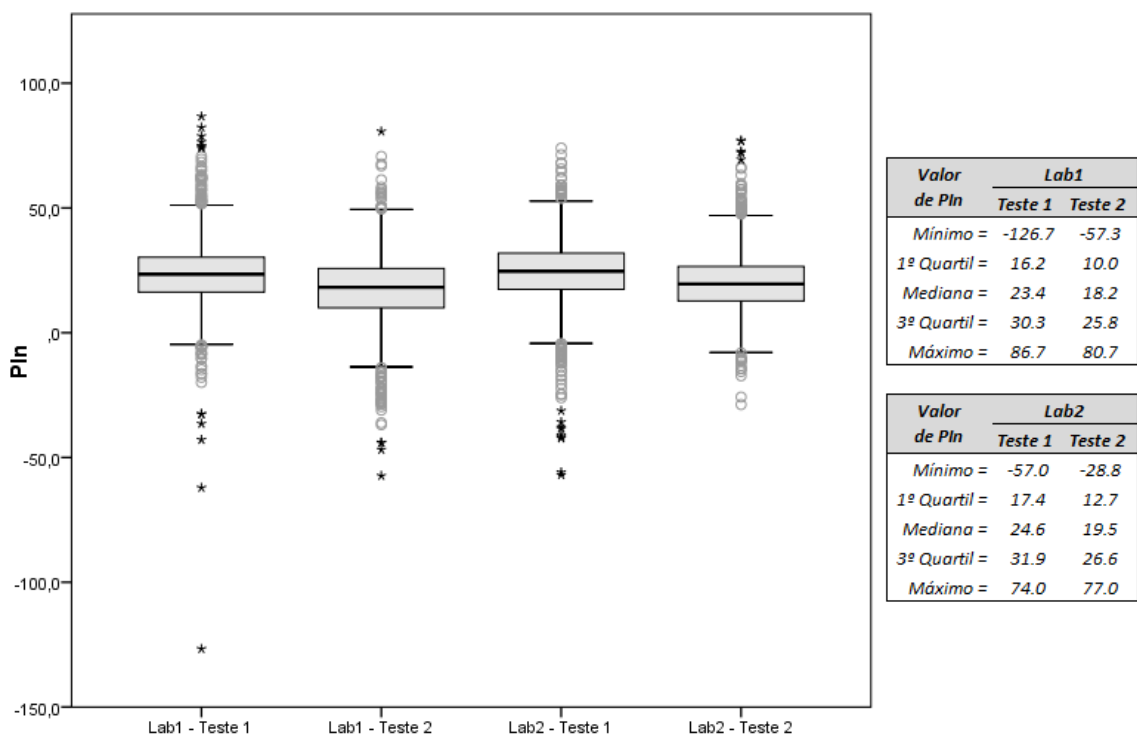


Figura 04. Box plots referentes aos percentuais de inibição (PIn) do ELISA 3ABC, segundo laboratório e teste realizado

Os valores de CCC apontaram para uma concordância moderada nos dois laboratórios avaliados, com resultados de 0.49 (IC95%: 0.46 a 0.52) no Lab1, e de 0.53 (IC95%: 0.50 a 0.57) no Lab2. A análise também foi realizada sem os valores discrepantes e os resultados observados foram semelhantes, mantendo-se a classificação moderada de concordância, com valores de CCC de 0.51 (IC95%: 0,48 a 0,55) e 0.56 (IC95%: 0,53 a 0,59), para os Lab1 e Lab2, respectivamente.

Os gráficos de dispersão entre a diferença e a média dos resultados obtidos nos dois testes, elaborados com base na proposta de Bland e Altman (1983, 1999, 2007), acompanhados dos gráficos de dispersão entre os valores de PIn dos dois testes, estão disponíveis nas Figuras 5 e 6, respectivamente para La1 e Lab2. De forma geral, nos dois laboratórios foi observada correlação positiva, de moderada a fraca, entre os resultados dos testes realizados, com expressiva dispersão a partir da linha de concordância. Mais uma vez fica evidenciada a presença de valores discrepantes nos dados avaliados, sendo que a retirada dos mesmos não afetou a interpretação final dos resultados. No Lab1, a diferença entre os testes (entendida como viés) revelou distanciamento médio significativo em relação a zero, igual 6,0 (IC95%: 5.5 a 6.5), sendo que em 95% das observações as diferenças variaram entre -18.7 (IC95%: -17.8 a -19.6) e 30.7 (IC95%: 29.8 a 31.6). No Lab2, a diferença média também distanciou significativamente do valor de zero (4.4; IC95%: 3.9 a 4.9), com 95% das diferenças ficando entre -17.9 (IC95%: -17.1 a -18.7) e 26.7 (IC95%: 25.9 a 27.5). No Lab1, a amplitude de diferença dos valores de PIn entre os testes, em 95% das observações, foi de 49,3; e no Lab2, de 44,6, com alta dispersão em relação aos valores médios.

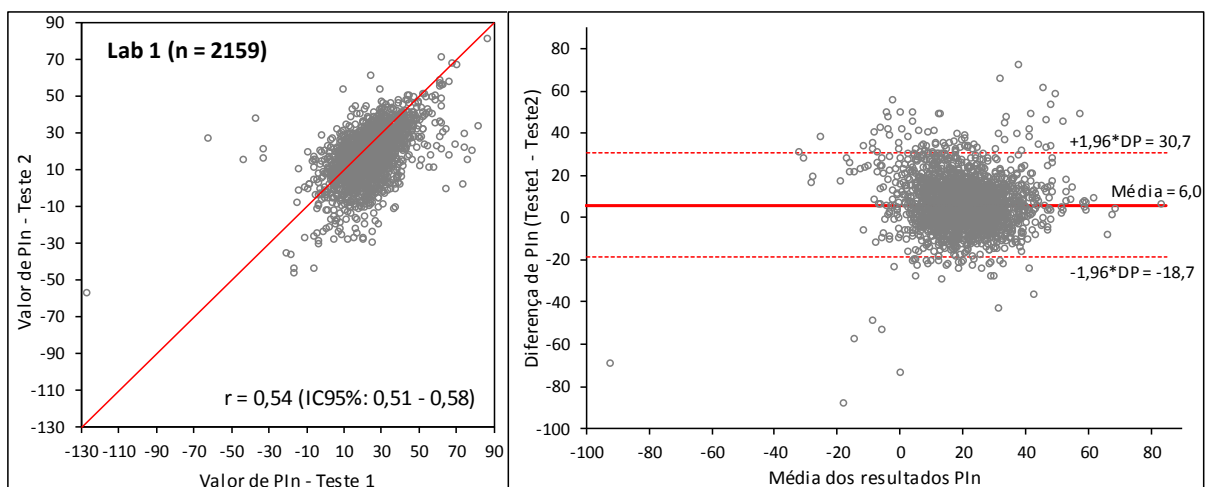


Figura 05. Gráfico de dispersão para os resultados de PIn obtidos no Lab1, referentes ao Teste 1 e Teste 2 (a) e referentes à diferença e a média entre Teste 1 e Teste 2 (b). No gráfico (a) a linha central representa a diagonal de coincidência entre resultados dos Testes 1 e 2.

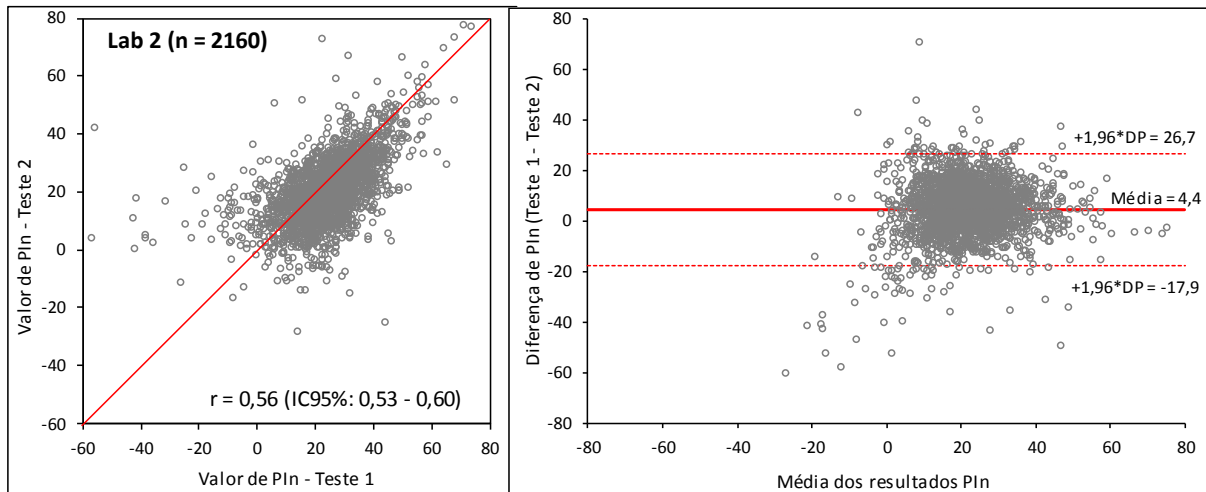


Figura 06. Gráfico de dispersão para os resultados de PIn obtidos no Lab2, referentes ao Teste 1 e Teste 2 (a) e referentes à diferença e média entre Teste 1 e Teste 2 (b). No gráfico (a) a linha central representa a diagonal de coincidência entre resultados dos Testes 1 e 2.

Análise dos resultados discretos (positivos e negativos)

Na Tabela 1 estão disponibilizados os valores das células das tabelas de contingência e na Tabela 2 os resultados do CK e das estatísticas complementares, segundo laboratório e grupos de análise. Como discutido, um ponto importante para análise de concordância é conhecer as características da distribuição dos totais marginais das tabelas de contingência, uma vez que influenciam diretamente na estimativa da concordância devido à chance e, por conseguinte, nos valores do coeficiente kappa. Feinstein e Cicchetti (1990), discutindo os paradoxos do CK, avaliam as distribuições dos totais marginais quanto ao seu equilíbrio (balanceamento) e simetria. Distribuições balanceadas são caracterizadas por proporções dos valores marginais, em relação ao total de unidades avaliadas, próximas a 50%; ou, segundo Shankar e Bangdiwala (2014), razões de f_1/f_2 e de g_1/g_2 próximas a 100%. Por sua vez, distribuições simétricas são aquelas onde a diferença entre os valores f_1 e f_2 e g_1 e g_2 estão na mesma direção. Distribuições simetricamente desbalanceadas levam a aumento de P_c , e conseqüente redução de CK (paradoxo 1), enquanto distribuições assimetricamente desbalanceadas levam à redução de P_c , com conseqüente aumento de CK (paradoxo 2). De acordo com estas definições, nos dois laboratórios considerados e para todos os subgrupos avaliados, as distribuições obtidas apresentaram-se de forma desbalanceada (percentuais de positivos e negativos distanciados de 50%) e simétrica (distanciamento dos percentuais de positivos e negativos segue a mesma direção nos ensaios realizados). A característica da distribuição dos totais marginais, segundo laboratório e grupos de análise, pode ser melhor avaliada por meio da Figura 7.

Tabela 01. Frequências das células das tabelas de contingência e valores das estatísticas complementares, segundo laboratório e grupos de análise

Laboratório e grupos de análise	Frequências da tabela 2x2					Proporções da tabela 2x2							
	a	b	c	d	N	p ₁₁	p ₂₁	p ₁₂	p ₂₂	f ₁	f ₂	g ₁	g ₂
<i>Grupo total</i>	13	4	45	2097	2159	0,006	0,002	0,021	0,971	0,027	0,973	0,008	0,992
<i>Lab1 Subgrupo 1</i>	8	1	34	171	214	0,037	0,005	0,159	0,799	0,196	0,804	0,042	0,958
<i>Lab1 Subgrupo 2</i>	5	3	11	1926	1945	0,003	0,002	0,006	0,990	0,008	0,992	0,004	0,996
<i>Lab1 Subgrupo 3</i>	7	4	31	1116	1158	0,006	0,003	0,027	0,964	0,033	0,967	0,009	0,991
<i>Lab1 Subgrupo 4</i>	5	0	10	587	602	0,008	0,000	0,017	0,975	0,025	0,975	0,008	0,992
<i>Grupo total</i>	17	9	23	2111	2160	0,008	0,004	0,011	0,977	0,019	0,981	0,012	0,988
<i>Lab2 Subgrupo 1</i>	12	4	22	238	276	0,043	0,014	0,080	0,862	0,123	0,877	0,058	0,942
<i>Lab2 Subgrupo 2</i>	5	5	1	1873	1884	0,003	0,003	0,001	0,994	0,003	0,997	0,005	0,995
<i>Lab2 Subgrupo 3</i>	4	4	8	859	875	0,005	0,005	0,009	0,982	0,014	0,986	0,009	0,991
<i>Lab2 Subgrupo 4</i>	9	3	7	880	899	0,010	0,003	0,008	0,979	0,018	0,982	0,013	0,987

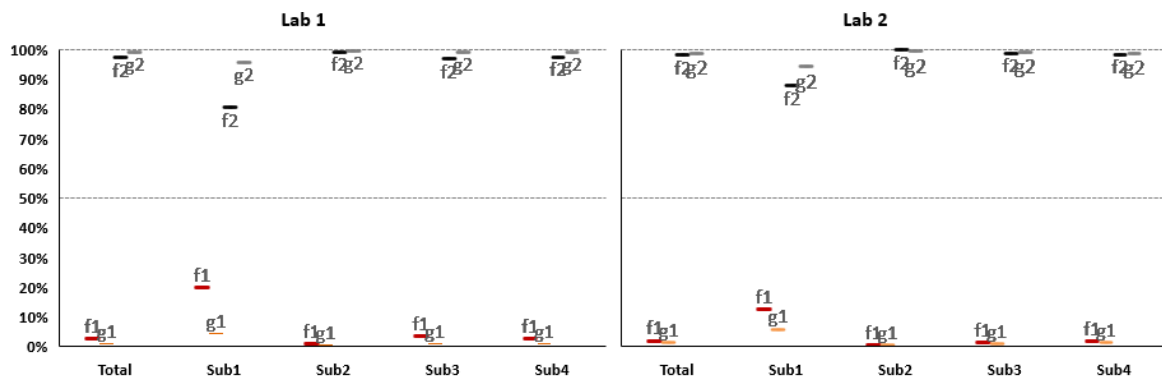


Figura 07. Representação gráfica das proporções dos totais marginais das tabelas 2x2

Quanto aos resultados de CK, de forma geral, foram observadas altas taxas de concordância observada (P_o) nos laboratórios e grupos avaliados. Os resultados de AC_1 revelam uma forte aproximação do CK com os valores de concordância observada, com menor intensidade para o subgrupo 1 dos dois laboratórios. De acordo com Xie (2013), AC_1 também é dependente da distribuição marginal, mas em uma menor extensão e em uma direção inversa à observada na clássica estatística de Cohen.

A representação gráfica dos valores de AC_1 , com respectivos intervalos de confiança, está disponível na Figura 8. Verifica-se diferença significativa entre os subgrupos 1 e 2, em ambos laboratórios, o que indica maior grau de discordância nas amostras com valores de P_{In} próximos ao ponto de corte considerado ($\geq 50\%$). Por outro lado, para os subgrupos 3 e 4, que buscam avaliar possível interferência da vacinação contra a FA, a análise dos intervalos de confiança indica ausência de diferença significativa para amostras oriundas de bovinos não vacinados ou com apenas um histórico de vacinação (Sub3) quando comparadas a amostras de bovinos com histórico de duas ou mais vacinações (Sub4). Resultados que ajudam a reforçar a redução da interferência da vacinação contra a FA nos resultados dos testes laboratoriais utilizados.

Tabela 02. Índices de concordância bruta e esperada, coeficiente Kappa (AC_1) e estatísticas complementares ao teste de concordância, segundo laboratório e grupos de análise.

Laboratório e grupos de análise	Coeficiente Kappa			Estatísticas complementares			
	P_o	P_c	λ (AC_1)	P_{pos}	P_{neg}	PI	BI
Lab1							
Grupo total	0.977	0.034	0.977 (0.970 a 0.983)	0.347	0.988	0.965	0.019
Subgrupo 1	0.836	0.210	0.793 (0.728 a 0.858)	0.314	0.907	0.762	0.154
Subgrupo 2	0.993	0.012	0.993 (0.989 a 0.997)	0.417	0.996	0.988	0.004
Subgrupo 3	0.970	0.041	0.968 (0.958 a 0.979)	0.286	0.985	0.958	0.023
Subgrupo 4	0.983	0.033	0.983 (0.972 a 0.993)	0.500	0.992	0.967	0.017
Lab2							
Grupo total	0.985	0.030	0.985 (0.980 a 0.990)	0.515	0.992	0.969	0.006
Subgrupo 1	0.906	0.165	0.887 (0.848 a 0.926)	0.480	0.948	0.819	0.065
Subgrupo 2	0.997	0.008	0.997 (0.994 a 0.999)	0.625	0.998	0.992	0.002
Subgrupo 3	0.986	0.023	0.986 (0.978 a 0.994)	0.400	0.993	0.977	0.005
Subgrupo 4	0.989	0.031	0.989 (0.982 a 0.995)	0.643	0.994	0.969	0.004

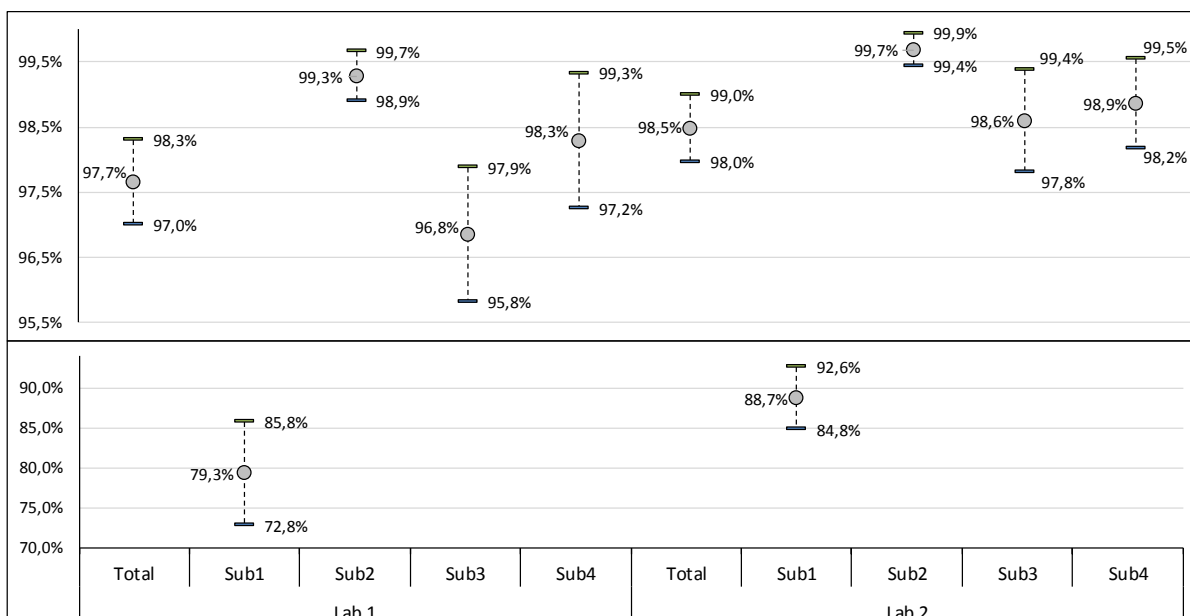


Figura 08. Resultados de AC_1 , com intervalo de confiança de 95%, segundo laboratórios e grupos de análise.

As estatísticas P_{pos} e P_{neg} podem variar, de forma independente, entre 0 e 1, e representam a concordância sobre casos positivos e sobre casos negativos, sendo que a média ponderada dos dois índices produz o valor P_o (CICCHETTI, 1988; CICCHETTI e FEINSTEIN, 1990). Segundo os autores, para um dado P_o , o CK será maior quando os valores de P_{neg} , P_{pos} e P_o são iguais ou semelhantes, e irá tornar-se progressivamente menor com o distanciamento dos valores de P_{pos} e P_{neg} em relação ao valor de P_o . Em síntese, altos valores de CK estão associados com P_{neg} e P_{pos} semelhantes entre si e com P_o , enquanto baixos valores de CK estão associados com P_{neg} e P_{pos} diferentes entre si e com o P_o . No presente trabalho, para ambos laboratórios e todos os grupos avaliados, os valores de P_{pos} distanciam-se fortemente dos valores de P_{neg} e de P_o . O padrão observado também favorece, para as abordagens clássicas de cálculo do CK, a ocorrência do paradoxo 1.

É reconhecido que o CK, nas abordagens clássicas, não se apresenta como medida de concordância estável, variando fortemente com diferentes níveis de prevalência e bias, frente a uma mesma taxa de concordância (BYRT et al., 1993; DI EUGENIO e GLASS, 2004). Para melhor compreensão e demonstração desta condição, são propostos os índices de prevalência (PI) e de bias ou viés (BI). PI mede a diferença nas probabilidades das respostas concordantes, e seus valores podem variar de -1 a 1, sendo igual a zero quando ambas as categorias são igualmente prováveis. BI, por sua vez, mede a diferença entre as proporções discordantes, com seu valor absoluto variando entre zero e 1 (zero apenas quando $f_1 = g_1$ e $f_2 = g_2$). PI está associado ao balanceamento da distribuição dos totais marginais (relação com o paradoxo 1) enquanto BI, com a sua simetria (relação com o paradoxo 2). O efeito da prevalência sobre a magnitude do CK é bem mais evidente do que o efeito de viés. Sim e Wright (2005) esclarecem que o efeito da prevalência aumenta à medida que a proporção de concordância sobre classificação positiva difere fortemente da classificação negativa. Cicchetti (1988) e Feinstein e Cicchetti (1990), discutindo o efeito da prevalência nos estudos de concordância, fazem um paralelo com testes de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade que podem ter baixo valor preditivo quando a prevalência da doença é baixa. No presente estudo, os valores de PI são altos, ou seja, a diferença entre a proporção de resultados positivos e negativos concordantes entre os dois testes é grande (próxima a 1), caracterizando distribuições desbalanceadas em níveis moderado a alto, segundo classificação proposta por Burn et al. (2008), e indicando a ocorrência do paradoxo 1, frente à análise clássica do CK. Quanto ao índice BI, os valores apresentam-se em níveis baixos, indicando baixo efeito de viés na análise realizada.

Considerações finais

Foram observados resultados distintos para análise quantitativa, considerando os valores de PIn, e para a análise com dados discretos, com base na classificação dos resultados como positivos ou negativos. Enquanto os valores de PIn revelaram expressiva variabilidade e indicaram nível apenas moderado de concordância entre os testes, a abordagem utilizando o coeficiente *Kappa*, pelo método AC₁, identificou excelentes níveis de repetibilidade nos dois laboratórios avaliados. Apesar das abordagens mostrarem-se divergentes, na realidade devem ser entendidas como complementares, e o estudo aponta para importância de serem apresentadas em conjunto. Como o banco de amostras avaliado apresenta alto percentual de resultados negativos, a diferença dos valores de PIn observada entre os testes, em sua maior parte, não alterou a classificação final das amostras, permitindo valores expressivos no teste AC₁. O reflexo dessa variabilidade ficou claro com os menores valores de AC₁ registrados no

subgrupo 1, nos dois laboratórios, envolvendo amostras com valores de PIn próximos ao ponto de corte considerado. Por outro lado, no subgrupo 2, com valores de PIn distantes do ponto de corte, os resultados para AC₁ foram significativamente os mais altos. Caso a abordagem ficasse restrita ao coeficiente *kappa*, a importante variabilidade observada nos resultados de PIn ficaria despercebida. Essa variabilidade deve ser considerada e procedimentos no âmbito interno dos laboratórios devem ser estudados visando melhor controle e conhecimento das causas envolvidas, conforme recomendações expressas no Capítulo 3.6.4 do Manual Terrestre (OIE, 2016), que trata da incerteza de medição nos ensaios laboratoriais. Como parte das explicações para a variabilidade observada nos valores de PIn, pode-se considerar diferenças entre kits e lotes do fabricante, assim como questões relacionadas com a conservação das amostras, elementos que devem ser investigados.

Os resultados obtidos no presente estudo, particularmente no método AC₁, contribuem para demonstrar boa confiança para os estudos epidemiológicos conduzidos com objetivo de apoiar a avaliação de transmissão do vírus da FA no país. Entretanto, como informado, o ensaio avaliado (ELISA 3ABC) é utilizado como teste de triagem nos referidos estudos epidemiológicos, com os resultados “positivos” submetidos a um teste confirmatório (EITB). Neste cenário, a variabilidade observada nos valores de PIn revela uma maior preocupação e destaca a importância na definição do ponto de corte a ser utilizado, buscando-se privilegiar a sensibilidade ou especificidade do sistema de investigação, de acordo com o cenário epidemiológico investigado. A incorporação da categoria de “indeterminado” entre os resultados do teste avaliado, apresenta-se como possível alternativa para melhorar a sensibilidade dos estudos para avaliação de transmissão viral. Em adição, visando uma avaliação completa do sistema de diagnóstico utilizado, recomenda-se a análise de repetibilidade também para o teste confirmatório (EITB), que se caracteriza por um menor grau de automação.

Bibliografia

ALONSO, A., GOMES, I. e BAHNEMANN, H. G., 1988: La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**, v. 54, p. 51-54.

ALONSO, A., GOMES, M. P. D., MARTINS, M. A. e SÖNDAHL, M. S., 1990: Detection of foot-and-mouth disease virus infection associated antigens antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay e agar gel immunodiffusion tests. **Preventive Veterinary Medicine**; v. 9, p. 233-40.

ALONSO, A. e SÖNDAHL, M. S., 1975: Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. **Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa**; v. 17-18: 1-8.

- ARGENTIERI, M. C., PILLA, D., VANZATI, A., LONARDI, S. e FACCHETTI, F., 2013: Antibodies are forever: a study using 12–26-year-old expired antibodies. **Histopathology**, 63, 869–876. DOI: 10.1111/his.12225.
- ATO, M; LÓPEZ, J. J. e BENAVENTE, A., 2011: A simulation study of rater agreement measures with 2x2 contingency tables. **Psicológica**, v. 32, p. 385-402.
- BARNHAR, H. X., HABER, M. J. e LIN, L. I., 2007: An Overview On Assessing Agreement With Continuous Measurement. **J Biopharm Stat.** 17(4):529-69.
- BARTLETT, J. W. e FROST, C., 2008: Reliability, repeatability e reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables. **Ultrasound Obstet Gynecol**; 31: 466–475
- BERGMANN, I.E., MELLO, P. A., NEITZERT, E., BECK, E. e GOMES, I., 1993: Diagnosis of persistent aphotavirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 825-831.
- BERGMANN, I. E. e MARILAT, E., 1996: Identification of foot-and-mouth disease virus-free regions by use of a standardized enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. **Am. J. Vet. Res.**, v. 57, p. 972-974.
- BERGMANN, I. E., MARILAT, V., NEITZERT, E., BECK, E., PANIZZUTTI, N., SÁNCHEZ, C. e FALCZUK, A., 2000: Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA 3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. **Arch Virol**, v. 145, p. 2021-2033.
- BERGMANN, I. E., NEITZERT, E., MARILAT, S. O., COLLING, A., SÁNCHEZ, C. e MELO, E. C., 2003a: Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay and its use as an epidemiological indicator of foot-and-mouth disease viral activity. **Arch Virol**, v. 148, p. 891-901. DOI 10.1007/s00705-002-0965-5
- BERGMANN, I. E., MARILAT, V., NEITZERT, E. e MELO, E. C., 2003b: **Validation of the I-ELISA 3ABC/EITB system for use in foot-and-mouth disease surveillance: overview of the South American experience.** Foot-and-Mouth Disease: control strategies. B. Dodet, M. Vicari, Eds. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. P. 361-370.
- BLAND, J. M. e ALTMAN, D. G., 2007: Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, 17: 571–582. DOI: 10.1080/10543400701329422
- BLAND, J. M. e ALTMAN, D. G., 1999: Measuring agreement in method comparison studies. **Statistical Methods in Medical Research**; 8: 135-160.
- BLAND, J. M. e ALTMAN, D. G., 1986: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 1, 529-569.
- BROCCHI, E., BERGMANN I. E., DEKKER, A., PATON, D.J., SAMMIN D. J., GREINER M., GRAZIOLI, S., SIMONE, F., YADIN, H., HAAS, B., BULUT, N., MALIRAT, V., NEITZERT, E., GORIS, N., PARIDA, S., SØRENSEN, K. e CLERCQ, K., 2006: Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. **Vaccine**, 24, 6966–6979. doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.050.

- BURN, C. C., PRITCHARD, J. C. e WHAY, H. R., 2008: Effects of prevalence on observer agreement: a subjective assessment of working donkey behavior as an example. **Proceedings of Measuring Behavior**. Maastricht, The Netherlands, August 26-29.
- BYRT, T., BISHOP, J. e CARLIN, J. B., 1993: Bias, prevalence and Kappa. **J. Clin. Epidemiol.**, v.46, n. 5, p. 423-429
- CICCHETTI, D. V., 1988: When diagnostic agreement is high, but reliability is low: some paradoxes occurring in joint independent neuropsychology assessments. **Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology**, v. 10, n. 5, p. 605-622.
- CICCHETTI, D. V. e FEINSTEINT, A. R., 1990: High agreement but low kappa: II. Resolving the paradoxes. **J. Clin. Epidemiol**, v. 43, n. 6, p. 551-558.
- COHEN, J., 1960: A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and Psychological Measurement**. Vol. XX, n. 1, p. 37-46.
- CUNNINGHAM, M., 2009: More than just the Kappa Coeficiente: a program to fully characterize inter-rater reliability between two raters. **SAS Global Forum. Statistics and Data Analysis**. Paper 242-2009. 7 p.
- DI EUGENIO, B. e MICHAEL, G., 2004: The Kappa Statistic: A Second Look. **Mathematics and Computer Science Faculty Publications**. v. 30, n. 1, p. 95-101. Paper 18. http://scholar.valpo.edu/mcs_fac_pubs/18
- DOHOO, I., MARTIN, W. e STRYHN, H., 2010: **Veterinary epidemiologic research**. National Library of Canada Cataloguing in Publication, 2 ed. ISBN 978-0-919013-60-5.
- FEINSTEINT, A. R. e CICCHETTI, D. V., 1990: High agreement but low kappa: I. The problems of two paradoxes. **J. Clin. Epidemiol**, v. 43, n. 6, p. 543-549.
- FLEISS, J. L.; COHEN, J. e EVERITT, B. S., 1969: Large Sample Standard Errors of Kappa and weighted Kappa. **Psychological Bulletin**, v. 72, n. 5, p. 323-327.
- GRANERO, M. G., 2009: Lin's concordance correlation coefficient: <http://gjyp.nl/marta/> (acessado em dezembro de 2016)
- GONÇALVES, V. S. P., SILVA, A. M. e MORAES, G. M., 2003: Random Sample Surveys Conducted in Brazil with a View to Substantiating the Expansion of the Free Zone of Foot-And-Mouth Disease where Vaccination is Practised. **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**. Available at www.sciquest.org.nz
- GORIS, N., PRAET, N., SAMMIN, D., YADIN, H., PATON, D., BROCCCHI, E., BERVENS, D. e DE CLERCQ, K., 2007: Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELSIA tests and true prevalence in the field. **Vaccine**, 25, 7177-7196.
- GWET, K. L., 2008: Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, v. 61, p. 29-48.
- HIRAKATA, V. N. e CAMEY, A. S., 2009: Bland-Altman analysis of agreement between methods. **Rev HCPA**;29(3):261-268.

JOHNSON, M., 2012: Antibody Shelf Life/How to Store Antibodies. Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States. **Mater Methods**, 2:120. [/dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.120](https://doi.org/10.13070/mm.en.2.120). Last modified: 2016-12-27; original version: 2012-10-12

KIRILENKO, A. P. e STEPCHENKOVA, S., 2016: Inter-coder agreement in one-to-many classification: fuzzy kappa. **PloS ONE**, v. 11, n. 3, 14 p. e0149787. doi: 10.1371/journal.pone.0149787.

KOMAGATA, N., 2002: Chance agreement and significance of the kappa statistic. <http://nobo.komagata.net/pub/Komagata02-Kappa.pdf>. (acessado em julho de 2016).

LEE, T. S., 2002: On Determination of sample size for the positive kappa coefficient. In JSM Proceedings, Survey Research Methods Section. Alexandria, VA: **American Statistical Association**, p. 2029 – 2033. Retrieved from <https://www.amstat.org/sections/srms/Proceedings/y2002/files/JSM2002-001144.pdf>

LIN, L. I., 1989: A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, v. 45, p. 255-268.

OIE - World Organisation for Animal Health, 1992: **International Animal Health Code: mammals, birds and bees**. 6th Edition. Paris, France.

OIE - World Organisation for Animal Health, 2016: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016**. (available at <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>)

PANAFTOSA – Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1980: El uso de las pruebas del antígeno asociado a la infección por virus (VIA) de la fiebre aftosa. **Serie de Monografías Científicas y Técnicas**, PANAFTOSA: RJ. n. 6, 36 p. ISSN 0101-4897

PANAFTOSA – Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 2000: Fiebre aftosa, instrumentos seroepidemiológicos para evaluar actividad viral: sistema para detección de anticuerpos contra antígenos no capsidales del virus de la fiebre aftosa. **Serie de Manuales Ditácticos**, PANAFTOSA, RJ. n. 16, 62 p.

POWERS, D. M. W., 2012: The Problem with Kappa. **Proceedings of the 13th Conference of the European Chapter of the Association for Computational Linguistics**. Avignon, France, April 23 – 27, p. 345–355. ISBN: 978-1-937284-19-0

ROGOT, E. M. A. e GOLDBERG, I. D. M. P. H., 1966: A proposed index for measuring agreement in test-retest studies. **J. chron. Dis.**, v. 19, p. 991-1006.

SHANKAR, V. e BANGDIWALA, S. I., 2014: Observer agreement paradoxes in 2x2 tables: comparison of agreement measures. **BMC Medical Research Methodology**, 14:100. doi: 10.1186/1471-2288-14-100. <http://www.biomedcentral.com/1471-2288/14/100>.

SIM, J. e WRIGHT, C. C., 2005: The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. **Physical Therapy**, v. 85, n. 3, p. 257-268.

UTTENTHAL, A, PARIDA, S, RASMUSSEN, T. B., PATON, D. J., HAAS, B. e DUNDON, W. G., 2010: Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. **Expert Rev. Vaccines** v. 9, n. 1, p. 73-87. DOI: 10.1586/erv.09.130

VIEIRA, A. J. e GARRETT, J. M., 2005: Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. **Family Medicine**, v. 37, n. 5., p. 360-363.

XIE, Q., 2013: Agree or Disagree? A Demonstration of An Alternative Statistic to Cohen's Kappa for Measuring the Extent and Reliability of Agreement between Observers. 2013 FCSM Research Conference Washington Convention Center, Washington, DC, November 4-6, (http://fcsm.sites.usa.gov/files/2014/05/J4_Xie_2013FCSM.pdf, acessado em julho de 2016).

WATSON, P. F e PETRIE, A., 2010: Method agreement analysis: A review of correct methodology. **Theriogenology**, 73, 1167–1179.

WONGPAKARAN, N.; WONGPAKARAN, T.; WEDDING, D. e GWET, K. L., 2013: A comparison of Cohen's Kappa and Gwet's AC1 when calculating inter-rater reliability coefficients: a study conducted with personality disorder samples. **Medical Research Methodology**, 13:61, 7 p. (<http://www.biomedcentral.com/1471-228/13/61>)

Capítulo 7

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAIS DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA INDUZIDOS PELA VACINAÇÃO: EXPERIMENTO A CAMPO CONDUZIDO EM ZONA LIVRE DE FEBRE AFTOSA COM VACINAÇÃO DO BRASIL, 2009 A 2011

Resumo

Para avaliar a indução de anticorpos contra proteínas não-estruturais do vírus da febre aftosa (FA) por vacinas fabricadas no Brasil, após a atualização do Regulamento Técnico para a produção, controle de qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra a FA, foi realizado um estudo experimental a campo com intervenção, do tipo longitudinal, utilizando-se de coortes fechadas e concorrentes. Foram utilizadas quatro vacinas de diferentes fabricantes, quatro propriedades rurais localizadas em diferentes estados integrantes da zona livre de FA com vacinação, e um total de 1.280 bovinos sem histórico de vacinação contra a doença. Os animais foram agrupados, aleatoriamente, em três coortes com intervenção (C1, C2 e C3), simulando diferentes estratégias de vacinação, e em uma coorte sem intervenção (CN). Parte da coorte C3 foi utilizada para simular o sistema de avaliação de qualidade das vacinas de acordo com as regras do novo Regulamento Técnico. Os animais foram seguidos por até 532 dias, com coleta de amostras a cada 14 dias, intervalo ampliado para 24 e 48 dias ao final do período de observação. As amostras, pareadas segundo a variável dias após vacinação, foram avaliadas pelo sistema de métodos laboratoriais I-ELISA 3ABC/EITB produzido pelo PANAFTOSA. A análise dos resultados envolveu técnicas estatísticas para dados de sobrevivência e medidas de frequência e associação, segundo dois cenários: um considerando como falha apenas os resultados positivos; e outro, considerando como falha os resultados positivos e os indeterminados. Para análise de sobrevivência, o método utilizado foi o de *Kaplan-Meier* para dados com censura à direita. Neste artigo, a análise realizada limitou-se em comparar os resultados por vacina utilizada e avaliar possíveis relações do “número de vacinações” e do “intervalo após última vacinação” com o desfecho investigado. De forma geral, a taxa de incidência de amostras positivas ficou próxima ao padrão de especificidade agregada do sistema de métodos laboratoriais utilizado. A análise do “número de vacinações” aponta para sua relação direta com a incidência de soropositivos ou indeterminados, demonstrando que, mesmo utilizando vacinas com reduzida capacidade de estimular a produção de anticorpos contra PNEs, são esperados resultados soropositivos decorrentes tanto de problemas de especificidade dos testes laboratoriais utilizados, como pela própria aplicação da vacina, como observado principalmente em animais com histórico de três ou quatro vacinações. Quanto ao “tempo após última vacinação”, os resultados obtidos apontam para seu menor impacto sobre a prevalência de soropositivos, conforme observado no cenário 1. Entretanto, para o cenário 2, foi registrada concentração significativa de falhas no período de 60 dias após a última vacinação, justificando-se a recomendação de distanciamento entre vacinação e coleta de amostras nos estudos epidemiológicos. Com base nas vacinas avaliadas, o estudo revela evidente redução de reatividade induzida pela vacinação, entretanto, aponta para persistência, mesmo que em níveis mais reduzidos, de associação entre a prática da vacinação e a presença de resultados positivos ou indeterminados ao sistema laboratorial utilizado.

Palavras-chave: FMD, DIVA tests, PNE, coorte, interferência vacinal

Introdução

A certificação de ausência de *transmissão*¹ do vírus da febre aftosa (FA), em países que utilizam a vacinação como estratégia de luta contra a doença, apresenta-se como um desafio para o serviço veterinário oficial. De um lado, rebanhos submetidos a forte e constante pressão vacinal têm maior chance de revelar anticorpos contra proteínas não-estruturais (PNEs) do vírus da FA induzidos pela vacinação, dificultando a distinção entre animais infectados e animais vacinados (KITCHING, 2002a, 2002b). Por outro lado, falhas na vacinação, ou na resposta à vacinação, podem contribuir para ocorrência de bolsões de baixa imunidade populacional, que, segundo alguns autores (CAPORALE et al., 2012; PATON et al., 2004), possibilitam a persistência da transmissão viral com características e níveis de difícil detecção pelos sistemas locais de vigilância, inclusive em relação ao componente representado pelos estudos epidemiológicos, delineados com objetivo de detecção do agente viral. Além destas questões, diretamente relacionadas com o uso da vacina, também devem ser consideradas as limitações dos testes laboratoriais utilizados para diferenciar animais infectados de animais vacinados, os denominados *Diva tests* (do inglês *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), que podem produzir resultados falso-positivos (PANAFTOSA, 2000; CLAVIJO et al., 2004; BROCCHI et al., 2006; CLERCK e PATON, 2009; CLAVIJO et al., 2015). Apesar do esforço epidemiológico conduzido com objetivo de descartar resultados falso-positivos como decorrentes de infecção pelo agente viral, a presença destes, na maioria das vezes, prevalece nas avaliações para certificação zoossanitária ou durante negociações de acordos comerciais. Este fato é agravado no caso da FA, onde está demonstrada, laboratorialmente, a presença de “portadores”, ou de animais “persistentemente infectados”, apesar de inúmeros experimentos fracassarem na demonstração da transmissão viral desses animais para animais susceptíveis, o que sugere uma questionável importância epidemiológica dos mesmos na difusão ou manutenção do agente viral nas condições de campo, excetuando-se o caso do búfalo-africano, *Syncerus caffer* (ROSENBERG e MELLO, 1974; OLASCOAGA, 1999; SUTMOLLER e OLASCOAGA, 2002; TENZIN et al., 2008; GARLAND e CLERCQ, 2011; PARTHIBAN et al., 2015; STENFELDDT et al., 2016;).

O desafio mencionado tornou-se mais evidente à medida em que o intercâmbio comercial entre países foi se ampliando, tomando maior dimensão a partir de 1992, quando a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) passou a reconhecer oficialmente a condição sanitária de país ou de zona livre da doença, com base nos conceitos de regionalização e zonificação incorporados

¹ terminologia adotada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) a partir da 24ª edição do Código Sanitário para os Animais Terrestres, em substituição ao termo *circulação* viral (OIE, 2015)

à 6ª edição do Código Sanitário para os Animais Terrestres (Código Terrestre) da OIE (OIE, 1992). Três anos depois, a questão foi reforçada com o Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias, firmado durante a Rodada do Uruguai de negociações comerciais multilaterais, ocasião em que foi criada a Organização Mundial do Comércio – OMC (WTO, 1995). Neste acordo, a regionalização foi incluída entre os princípios técnicos e científicos que devem nortear o comércio entre países, ficando a OIE identificada como organismo internacional de referência para questões relativas à saúde animal e às zoonoses (GONÇALVES e MORAES, 2017). No caso específico da FA, o reconhecimento de zona livre, inicialmente, ficou limitado a rebanhos não submetidos à vacinação (OIE, 1992). Somente na 7ª edição do Código Terrestre, publicada em 1998, foi incorporada a opção de reconhecimento de zona livre de FA onde se pratica a vacinação (OIE, 1998), após intenso embate entre os países membros, o que, de certa forma, exemplifica a complexidade do tema. Na realidade, alguns países de relevância no comércio mundial, na prática, não reconhecem esta condição zoossanitária.

No Brasil, o programa de luta contra a FA, oficialmente iniciado em 1963, foi reformulado no início dos anos 1990 (REVISÃO..., 1992), seguindo as orientações do Plano Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa (PHEFA), acordado entre os países sul-americanos em 1988 (SARAIVA e GEALE, 2008; PANAFOSA, 2011; NARANJO e COSIVI, 2013), e utilizando-se das diretrizes de zonificação presentes no Código Terrestre (OIE, 1992). Dessa forma, no país foi implantado o Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa (PNEFA), tendo como meta a erradicação da doença por meio da implantação gradativa de zonas livres, geograficamente delimitadas a partir da identificação de circuitos pecuários (BRASIL, 1993). A implantação das zonas livres foi iniciada a partir do circuito pecuário constituído por estados da Região Sul, em 1998, e finalizada na Região Norte, em 2018. Todos os pleitos enviados à OIE continham informações sobre o sistema de vigilância implantado no país, destacando-se os estudos epidemiológicos com objetivo de avaliação de transmissão viral, com delineamentos específicos, adequados às características geográficas e produtivas das localidades envolvidas. Todos os estudos incluíram a realização de exames clínicos, investigações epidemiológicas e aplicação de testes sorológicos para detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA, representantes dos *Diva tests* (MARIN et al., 1992; CAMERON e PALDOCK, 1998; ZILLER et al., 2002; UTTENTHAL et al., 2010; FAO, 2014; OIE, 2014). Na maior parte desses estudos, foram observados animais soropositivos. Entretanto, com base nas investigações realizadas, não foram encontradas evidências clínicas ou epidemiológicas compatíveis com transmissão viral, ficando demonstrado que os resultados soropositivos encontrados não estavam relacionados à infecção pelo vírus da FA. Especialmente nos estudos conduzidos até 2007, a análise da distribuição de

soropositivos segundo o número de vacinações aplicadas aos animais revelou que parte dos resultados estavam associados ao número e frequência da vacinação, evidenciando um modelo vacinal de reatividade em contraponto ao modelo epidemiológico esperado em uma população submetida a processo infeccioso (GONÇALVES et al., 2003). Também foi possível observar que algumas marcas de vacinas comercializadas no país apresentavam maior probabilidade de induzir a produção de anticorpos contra PNEs. Diante destes resultados, e atendendo solicitação do serviço veterinário oficial, as indústrias brasileiras produtoras de vacinas contra a doença reforçaram a implantação de procedimentos visando melhorias das fases de purificação e clarificação das suspensões virais, buscando um produto final com níveis aceitáveis quanto à presença de PNEs. Em 2008, o “Regulamento Técnico para a Produção, Controle da Qualidade, Comercialização e Emprego de Vacinas Contra a Febre Aftosa” (Regulamento Técnico) utilizado no país foi atualizado, incorporando a obrigatoriedade de avaliação das partidas de vacinas contra a FA, antes de sua comercialização, quanto à capacidade de induzir a formação de anticorpos contra PNEs nos animais vacinados – avaliação de “pureza” (BRASIL, 2008). Este Regulamento sofreu nova atualização no início de 2018 (BRASIL, 2018), mantendo-se a regra de decisão acordada que, em síntese, estabelece a aprovação apenas de partidas de vacinas com ausência de bovinos soropositivos frente aos testes de detecção de anticorpos contra PNEs, a 28 dias após vacinação e entre 28 e 42 dias após revacinação. Os testes são realizados nos 18 animais utilizados na prova de avaliação de potência, o que atende às recomendações da OIE (OIE, 2017).

Diante do exposto e considerando a importância do tema para o país, a presente investigação foi motivada pela necessidade de obtenção de um diagnóstico de situação sobre reatividade contra PNEs consequente da vacinação, identificada pelos testes sorológicos utilizados nos estudos de transmissão do vírus da FA, após a implantação do novo Regulamento Técnico. Buscou-se avaliar a possível indução de anticorpos contra PNEs por algumas vacinas produzidas no país, utilizadas em diferentes esquemas de vacinação, e reproduzir o sistema de avaliação de qualidade previsto no Regulamento Técnico brasileiro. Para isto, foi realizado experimento a campo, do tipo prospectivo, entre 2009 e 2011, com parte dos resultados, de caráter mais descritivo, disponibilizada neste artigo. O estudo contou com apoio técnico do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA) e foi resultado de parceria entre o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN); os serviços veterinários estaduais do Mato Grosso (INDEA – Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso), Minas Gerais (IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária) e Rondônia (IDARON – Agência de Defesa Sanitária Agropastoril do Estado de Rondônia); e o setor produtivo, representado pelos proprietários rurais que disponibilizaram suas fazendas e rebanhos para a realização do trabalho.

Material e métodos

Considerações gerais sobre o delineamento

Caracteriza-se por um estudo experimental com intervenção (manipulação do fator de risco, entendido como: número de doses de vacina aplicadas às unidades experimentais), do tipo longitudinal, utilizando-se de coortes fechadas e concorrentes. Foram utilizadas três coortes com intervenção (expostas ao fator de risco), configuradas para atender requerimentos específicos do estudo, e uma sem exposição ao fator de risco (não vacinados), representando o controle negativo (CN). As coortes foram acompanhadas por um determinado período de tempo, com coleta de soro sanguíneo para avaliação do desfecho pesquisado (falha = detecção de anticorpos contra PNEs do vírus da FA pelo sistema de métodos laboratoriais utilizado, neste artigo, limitada a sua primeira ocorrência).

Os principais requerimentos que fundamentaram o delineamento do estudo foram:

- a. representação, de forma aproximada, de esquemas de vacinação de bovinos jovens, principal grupo etário considerado nos estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral. Como estes animais usualmente são comercializados para a complementação do ciclo produtivo, foram incluídas vacinações de reforço para simular atendimento às normas para trânsito, que exigem, pelo menos, duas doses de vacina contra a FA antes da movimentação;
- b. reprodução do modelo de avaliação de “pureza”, com ampliação do número de animais testados, considerando a hipótese de que 18 bovinos, entre 18 e 24 meses sem histórico de vacinação, utilizados nas provas oficiais de controle de qualidade de vacinas para avaliá-las quanto à capacidade de indução de anticorpos contra PNEs em bovinos vacinados, não constituem adequado número de observações para reproduzir o evento, caso a vacina não apresente alto grau de impureza (presença de PNEs);
- c. definição do período de acompanhamento das coortes, incluindo atividades de sangria e vacinação, com base na expectativa de produção de anticorpos circulantes contra PNEs a partir da vacinação e pela racionalidade operacional do trabalho a campo;
- d. manipulação do fator de risco, considerando que em estudos soropidemiológicos conduzidos no país, observou-se, para os soropositivos, relação direta com o número de vacinações e relação indireta com o intervalo de tempo desde a última vacinação;
- e. histórico de resultados obtidos em estudos epidemiológicos conduzidos no país, no período de 1999 a 2004, onde o percentual médio de bovinos soropositivos, segundo vacina utilizada, foi de 3%, destacando-se que, para as vacinas com maior grau de impureza, o percentual de bovinos soropositivos variou de 5,1% a 11,5%;
- f. realização do estudo em diferentes estabelecimentos rurais localizados em zona livre do país, com ingresso controlado de animais, utilização de sistemas de identificação individual do rebanho, presença de boa estrutura para manejo e contenção, e com boa disponibilidade de acesso durante todo o ano; e
- g. utilização de vacinas produzidas por diferentes indústrias de acordo com a disponibilidade de partidas submetidas aos novos testes de qualidade do MAPA, observando que a utilização de vacinas de diferentes fabricantes (distintos níveis de pureza) pode apresentar comportamentos diferenciados quanto à indução de anticorpos contra PNEs.

O período de seguimento do estudo foi definido em 532 dias, com sangrias realizadas em intervalos de 14 dias, ampliados para 24 e 48 dias ao final do período de observação. Para atendimento ao item “a” acima, foram configuradas as coortes C1 e C2, que se diferenciam pela idade dos animais ao início do período de observação: C1, constituída por bovinos com idade inferior a quatro meses, e C2, por bovinos com idade entre 6 e 12 meses. Em ambas as coortes, os animais foram vacinados no dia zero, com revacinação aos 126 dias após vacinação e vacinação sistemática a cada 182 após última vacinação. Particularmente na coorte C2, foi incluída uma revacinação aos 42 dias após vacinação do dia zero, para simular vacinação de reforço em animais no período de desmame e início das atividades de comercialização para recria. Uma intervenção adicional (manipulação do fator risco) ficou representada pela revacinação de unidades experimentais aleatoriamente selecionadas (correspondendo a 70% do total inicial em cada coorte) ocorrendo aos 42 dias após o reforço realizado aos 126 dias de observação, com objetivo de intensificar a ocorrência do efeito investigado, caso o mesmo esteja associado à vacinação.

Para atendimento ao item “b”, foi constituída a coorte C3, composta por bovinos entre 18 e 24 meses de idade, negativos aos testes sorológicos para avaliar a presença de anticorpos estruturais e não-estruturais do vírus da FA, conforme condição prevista nas normas do novo Regulamento Técnico. Esta coorte inicia-se reproduzindo o modelo de avaliação de “pureza das vacinas” com uma revacinação a 28 dias após vacinação e avaliação quanto à presença de anticorpos contra PNEs aos 42 dias após revacinação, quando se estabeleceu o mecanismo de vacinação semestral a partir do dia zero. O processo de intervenção adicional nesta coorte ocorreu aos 70 dias após primeira vacinação semestral, revacinando-se 70% da coorte inicial.

O número de unidades experimentais requeridas para cada tratamento, aqui representado pelas vacinas utilizadas, e para cada coorte com intervenção, ficou estabelecido em 100 unidades, calculado com base em Lwanga e Lemeshow (1991), considerando uma prova unicaudal; 4% de casos entre os expostos ao risco, para animais multivacinados; 0,05% de casos entre os não expostos (falta de especificidade do sistema de métodos laboratoriais utilizado); 10% de nível de significância; e 80% de poder do teste. Por restrições operacionais e de custo não foi possível considerar a mesma quantidade de unidades experimentais no contexto das sub coortes estabelecidas pelo mecanismo de intervenção adicional. Para a coorte CN, o número de unidades experimentais foi reduzido para 80 animais. Destaca-se que a coorte CN também teve as funções de vigilância ativa para FA, visando certificar a ausência de transmissão viral nos estabelecimentos participantes e gerar informações para avaliar a especificidade do sistema de métodos laboratoriais no contexto do experimento. Os animais selecionados receberam identificação específica para o estudo e permaneceram em convivência com os animais pertencentes aos grupos com intervenção durante todo o trabalho. Com base na estratégia utilizada, uma mesma unidade experimental da coorte CN foi utilizada como controle para diferentes grupos com intervenção, de acordo com o calendário de coleta de amostras.

Um resumo do total previsto de unidades experimentais por coortes consideradas, segundo propriedade participante e vacina utilizada, está disponível na Tabela 1. Representação esquemática da configuração proposta para estas coortes pode ser avaliada na Figura 1.

Tabela 01. Total de unidades experimentais segundo coorte, vacina e propriedade rural

Coorte	Idade dos animais ao início do experimento	Vacina	Unidades experimentais				Total
			Propriedades rurais				
			MG	MT-1	MT-2	RO	
C1	Bovinos com idade inferior a 4 meses	Vac1	20	25	30	25	100
		Vac2	20	25	30	25	100
		Vac3	20	25	30	25	100
		Vac4	20	25	30	25	100
		Total C1	80	100	120	100	400
C2	Bovinos com idade entre 6 e 12 meses	Vac1	20	30	30	20	100
		Vac2	20	30	30	20	100
		Vac3	20	30	30	20	100
		Vac4	20	30	30	20	100
		Total C2	80	120	120	80	400
C3	Bovinos com idade entre 18 e 24 meses	Vac1	20	30	30	20	100
		Vac2	20	30	30	20	100
		Vac3	20	30	30	20	100
		Vac4	20	30	30	20	100
		Total C3	80	120	120	80	400
Total coortes com intervenção (C1 + C2 + C3)		Vac1	60	85	90	65	300
		Vac2	60	85	90	65	300
		Vac3	60	85	90	65	300
		Vac4	60	85	90	65	300
		Total	240	340	360	260	1.200
CN	Bovinos com idade inferior a 12 meses	Total CN	20	20	20	20	80
Total Geral			260	360	380	280	1.280

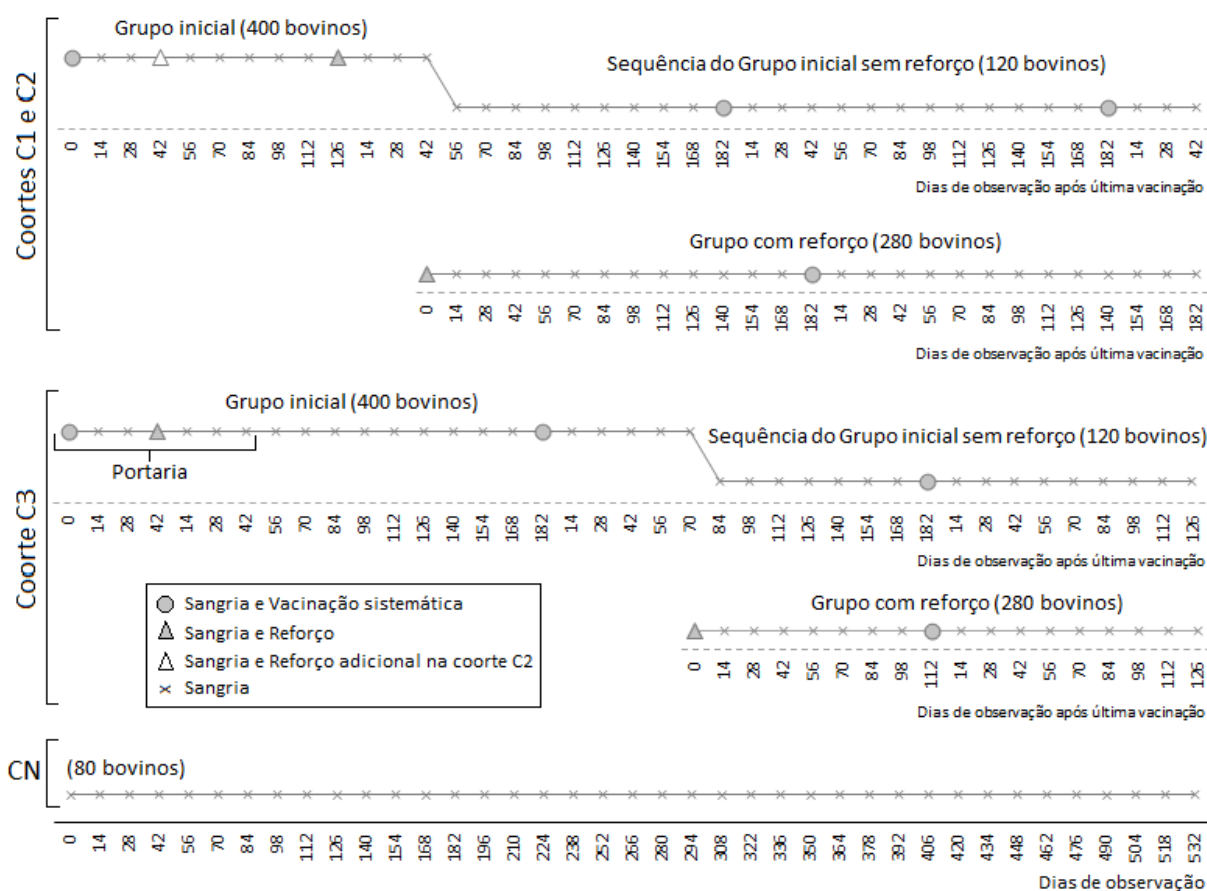


Figura 01. Representação esquemática das coortes com intervenção (C1, C2 e C3) e sem intervenção (CN)

Vacinas utilizadas

No começo dos trabalhos, em 2009, havia disponibilidade de quatro marcas de vacina contra a FA, pertencentes a quatro diferentes indústrias produtoras, com partidas aprovadas com base no novo Regulamento Técnico e com prazo de validade além da última vacinação prevista no estudo (janeiro de 2011). Estas partidas receberam códigos específicos para o estudo, sendo apresentadas neste trabalho como Vac1, Vac2, Vac3 e Vac4.

Propriedades rurais

O experimento foi realizado em quatro propriedades rurais, uma localizada no município de Paracatu, MG, duas no município de Tangará da Serra, MT, e uma no município de Chupinguaia, RO, identificadas neste estudo como MG, MT-1, MT-2 e RO, respectivamente. Todos os rebanhos tinham como finalidade principal a produção de carne, com criação a pasto e suplementação mineral, em sistema de produção do tipo ciclo completo, com os animais identificados individualmente. A vacinação contra a FA foi suspensa nas propriedades durante o ano de 2008, de forma que todos os animais selecionados como unidades experimentais eram nascidos nas propriedades rurais e não apresentavam histórico de vacinação contra a doença. Todos os produtores assinaram termos de cooperação técnica com o MAPA e o SINDAN, comprometendo-se, entre outras questões, a não comercializar os animais selecionados para realização do estudo e a seguir todos os requisitos técnicos e operacionais do trabalho.

Aleatorização, confidencialidade, controle das informações e processamento cego das amostras

A execução do estudo incluiu os seguintes procedimentos:

- seleção aleatória das unidades experimentais de cada coorte, com base na totalidade de animais existentes em cada estabelecimento participante do estudo, que receberam identificação específica do experimento, além da utilizada pelos proprietários;
- alocação proporcional de unidades experimentais segundo indústria produtora da vacina e propriedade rural. A similaridade na composição das amostras por vacina, para a variável idade, foi avaliada utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quanto ao sexo dos animais selecionados, foi dada preferência para participação de fêmeas, tendo em vista o menor interesse de comercialização destes animais e, conseqüentemente, maior facilidade de manutenção dos mesmos nas propriedades participantes durante todo o experimento;
- descaracterização dos frascos de identificação das vacinas utilizadas, dificultando o reconhecimento das marcas comerciais no momento de sua aplicação. Essa descaracterização foi realizada pelo MAPA quando da obtenção dos frascos na central de armazenamento e distribuição de vacinas mantida no país, utilizando-se de invólucro metálico com lacre. Os frascos de vacinas descaracterizados e com códigos específicos do estudo foram enviados em quantidade necessária para as atividades de vacinação dos grupos com intervenção. Os

procedimentos de aleatorização adotados permitiram a utilização das marcas de vacinas selecionadas em todas as propriedades participantes do experimento, garantindo as mesmas condições de campo e de manejo. Durante todo o transporte e nas propriedades participantes, as vacinas foram mantidas à temperatura entre 2 e 8°C;

- seleção aleatória das unidades experimentais para estabelecimento das sub coortes com intervenção e sem intervenção, segundo propriedade rural e indústria produtora da vacina;
- utilização de uma aplicação Web, desenvolvida e hospedada pelo MAPA, garantindo ao final de cada atividade de coleta de amostras de soro sanguíneo e de vacinação, inserção pelos serviços veterinários estaduais das informações produzidas, incluindo armazenamento de cópias eletrônicas dos formulários utilizados para registro das atividades; e
- especificamente para codificação das amostras, o sistema gerava novos códigos de identificação para envio ao laboratório em lugar do número de brinco de identificação dos animais, garantindo processamento das amostras sem qualquer informação sobre seus resultados anteriores. Os resultados laboratoriais, por sua vez, foram inseridos no sistema pela equipe de profissionais do LANAGRO/RS, para acesso exclusivo da equipe de coordenação do estudo. O sistema utilizado garantiu relação inequívoca entre a identificação individual dos animais e os códigos gerados para as amostras coletadas.

Soros controle positivo

O delineamento incluiu, junto aos soros obtidos das unidades experimentais, alíquotas de soros sabidamente positivos ao sistema de métodos laboratoriais quanto à presença de anticorpos contra PNEs do vírus da FA, preparados e categorizados pelo PANAFIOSA, como fraco positivo, com reatividade estudada e conhecida à prova de *screening* do sistema ELISA 3ABC/EITB, levemente superior ao CP1 (soro controle positivo, padrão I da prova); e como forte positivo, com reatividade similar ao CP2 (soro controle positivo, padrão II da prova). A implantação do sistema de envio ao laboratório de soros controle positivo ocorreu após transcorridos cerca de metade do período de observação do experimento. A utilização cega deste tipo de controle teve como objetivo principal fornecer dados básicos que permitissem averiguar se, durante a realização do experimento, o instrumento de medição sofreu variações importantes de sensibilidade e se as amostras apresentavam nível adequado de qualidade, especialmente no que diz respeito à conservação, questões capazes de introduzir viés à investigação. As alíquotas foram preparadas em um único lote e distribuídas aos serviços veterinários dos estados envolvidos, armazenadas à temperatura de -20°C até o momento de envio ao laboratório, conforme programação elaborada pela equipe de coordenação do estudo. Para garantir a análise cega pelo laboratório, as alíquotas foram envasadas e identificadas seguindo o mesmo padrão das amostras das coortes, e misturadas às demais amostras durante as remessas ao laboratório.

Pareamento de Sangrias

As coletas de soro sanguíneo foram pareadas para que a medição do efeito estivesse temporalmente estabelecida em relação à administração do estímulo (vacinação), independente de quando e onde tenha sido realizado. Neste contexto, a execução do estudo foi norteadada por calendário de atividades previamente estabelecido pela equipe de coordenação do MAPA.

Testes laboratoriais

Para identificação de anticorpos contra PNEs, foi utilizado o sistema de métodos laboratoriais produzido pelo PANAFTOSA, constituído de kit I-ELISA 3ABC (*Indirect – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), como teste de triagem, e da prova EITB (*Western Blot* de Imunoeletrotransferência), como teste confirmatório (possibilita a detecção de anticorpos contra as seguintes PNEs do vírus da FA: 3ABC, 3D, 2C, 3B e 3A). Os testes laboratoriais foram executados pela unidade de diagnóstico do MAPA localizada em Porto Alegre, RS (LANAGRO/RS), com acreditação pela ISO 17025, seguindo as orientações técnicas do produtor (PANAFTOSA, 2012a e 2012b).

Todas as amostras de soro sanguíneo foram processadas pelo teste I-ELISA 3ABC, sendo classificadas, segundo PANAFTOSA (2012a), como “não reativas” ($T/C < 0,8$), “inconclusivas ou suspeitas” ($0,8 \leq T/C < 1,0$) ou “reativas” ($T/C \geq 1,0$). Todas as amostras classificadas como inconclusivas ou reativas ao I-ELISA 3ABC foram processadas no EITB, recebendo a seguinte classificação (PANAFTOSA, 2012b):

- *Reativa*: reatividade para 3ABC, 3D, 3B e 3A ($\pm 2C$) com intensidade igual ou superior àquela encontrada na banda correspondente ao soro controle CP1;
- *Não reativa*: quando observada uma das seguintes condições:
 - ✓ ausência total de reação para as cinco proteínas ou,
 - ✓ reatividade com intensidade menor àquela encontrada na banda correspondente do CP1 para cada uma das cinco proteínas, individualmente ou em conjunto ou,
 - ✓ reatividade igual ou maior àquela encontrada na banda correspondente do CP1 para, no máximo, duas proteínas simultaneamente.
- *Indeterminada*: quando o padrão de bandas não corresponde aos parâmetros definidos para amostras reativas ou não reativas.

Neste artigo, os termos “reativo” e “não reativo” serão tratados como “positivo” e “negativo”, respectivamente.

Para bovinos, os valores de sensibilidade e especificidade do Kit I-ELISA 3ABC, com base no trabalho de Goris et al. (2007), são, respectivamente, 95,9% (IC95%: 90,6% – 99,9%) e 95,5% (IC95%: 92,4% – 98,2%). Para a prova EITB, segundo PANAFTOSA (2012b), a sensibilidade está próxima de 100% e a especificidade é de 99%, para animais com idade abaixo de 24 meses em rebanhos vacinados. Considerando que os testes laboratoriais serão utilizados em série, os valores agregados para o sistema de diagnóstico são de, aproximadamente, 94,94% para sensibilidade e de 99,95% para especificidade, considerando valores médios do I-ELISA 3ABC e valor de 99% para sensibilidade e especificidade para o EIBT.

Coordenação

O estudo foi coordenado pelo MAPA e executado pelos serviços veterinários estaduais, com acompanhamento do MAPA e do SINDAN. Para execução das atividades de campo foram elaborados manuais e formulários específicos e todos os profissionais envolvidos participaram de treinamentos conduzidos pelo MAPA.

Análise dos resultados

Neste artigo, a análise está limitada à avaliação de medidas de frequência e de associação próprias para estudos de coorte (KLEINBAUM et al., 2007), e à utilização de técnicas estatísticas para dados de sobrevivência com objetivo de investigar o tempo de ocorrência do evento, ou falha, até sua primeira manifestação, conforme orientações e conceitos apresentados por Dohoo et al. (2010), Carvalho et al. (2011) e Fávero (2015). Em artigos posteriores, a análise será estendida ao contexto de multieventos. Tendo em vista que a classificação final dos testes laboratoriais inclui três categorias de resultados (negativo, indeterminado e positivo), a análise considerou dois cenários: cenário 1, interpretando os resultados indeterminados como negativos (falha = soropositivo); e cenário 2, interpretando os resultados indeterminados como positivos (falha = soropositivo ou indeterminado). Na prática, o cenário 2 é o que se adota nas atividades de vigilância conduzidas no país, uma vez que animais com resultados indeterminados são submetidos aos mesmos procedimentos de investigação adotados para animais soropositivos.

Para a análise de frequência e associação serão apresentadas e discutidas as seguintes medidas:

- Densidade de Incidência (DI) = número de eventos novos (falhas) que ocorreram em um intervalo de tempo específico, dividido pela quantidade total de períodos de observação acumulados durante referido intervalo de tempo. O denominador é obtido somando os períodos de tempo em que cada bovino esteve sob observação no estudo (e sob o “risco” de ter o desfecho investigado). Seu valor varia de zero a infinito, sendo expresso por unidade de tempo.
- Razão de densidade de incidência (RDI) = refere-se à divisão das densidades de incidência (DI) obtidas em duas coortes com condições distintas, geralmente entre grupo com intervenção e grupo sem intervenção, onde, $RDI > 1$ significa que a intervenção, ou outra determinada condição, contribuiu para o desfecho; $RDI = 1$, a intervenção não influenciou para o desfecho; e $RDI < 1$, a intervenção representou um fator de proteção para o desfecho.

Para inferência estatística das medidas DI e RDI, estão apresentados intervalos com 95% de confiança (IC95%) e testes de hipótese elaborados com base no Qui-Quadrado de Mantel-Haenszel e no teste Exato de Fisher, com significância de 5% ($\alpha = 5\%$).

Destaca-se que a análise de sobrevivência aborda problemas nos quais a ocorrência do evento não é constante ao longo do tempo, possibilitando estimar a probabilidade de ocorrência de determinado evento após certo tempo de seguimento ou avaliar como se comportam a função de sobrevivência ao evento e a função da taxa de risco de ocorrência do evento para cada período de observação (FÁVERO, 2015).

A análise exploratória dos dados de sobrevivência envolve o cálculo de funções específicas, destacando-se: Função de sobrevivência $S(t)$, que significa a probabilidade de um indivíduo “sobreviver” (não ocorrer a falha) por mais do que um intervalo de tempo t , ou por, no mínimo, um tempo igual a t ; e a função de falha acumulada, $F(t)$, definida como a probabilidade de uma observação não sobreviver (ocorrer a falha) ao tempo t , isto é, $F(t) = 1 - S(t)$. Como o presente estudo envolveu dados censurados à direita, ou seja, inexistência do evento até determinado instante de tempo, o cálculo das funções de sobrevivência, conforme orientações dos autores citados, baseou-se na estimativa *Kaplan-Meier*. Este procedimento tem a vantagem de evitar o pressuposto de que as falhas ocorrem uniformemente ao longo do tempo e de que o risco ocorre de forma constante durante os intervalos arbitrariamente selecionados (DOHOO et al., 2010). Para comparação das curvas de sobrevivência empregou-se o teste de hipótese Log-rank (uma variação do teste Mantel-Haenszel), que compara os valores observados e esperados de cada estrato sob a hipótese nula de que o risco é o mesmo em todos os grupos (CARVALHO et al., 2011). Rejeitar a hipótese nula quer dizer que, pelo menos, uma das curvas difere significativamente das outras em algum momento do tempo.

Para atendimento dos objetivos propostos neste artigo, inicialmente, os resultados por vacina, considerando o conjunto de dados das três coortes com intervenção (C1, C2 e C3), foram comparados entre si e com a respectiva coorte não exposta (CN). Na sequência, considerando-se apenas os dados das coortes C1 e C2, que melhor retratam as condições investigadas nos estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral, e de forma conjunta para as vacinas utilizadas, foram avaliadas sub coortes originadas a partir do mecanismo de intervenção, com uma, duas, três ou quatro vacinações (“número de vacinações”) e a medida de tempo considerada foi expressa em dias após a última vacinação (“intervalo após última vacinação”) para observação do desfecho investigado. Para isso, os dados de sobrevivência das coortes/ C1 e C2 foram tratados de forma conjunta e reagrupados nas categorias “1 vacinação” (N1), “2 vacinações” (N2), “3 vacinações” (N3) e “4 vacinações” (N4). Buscando simular períodos entre etapas semestrais de vacinação, época em que são conduzidos os estudos de avaliação de transmissão viral, o tempo de observação foi limitado a 182 dias e os animais foram seguidos a partir da alteração do histórico de vacinação (truncamento à esquerda), participando do agrupamento independentemente de ocorrência de falha no período anterior. O intervalo após última vacinação foi avaliado considerando os períodos “até 56 dias” (T1), “70 a 112 dias” (T2) e “126 a 182 dias” (T3), que retratam os terços inicial, médio e final entre etapas semestrais de vacinação contra a FA.

Para a coorte C3, a análise dos resultados ficou limitada à identificação de ocorrência de falhas durante o período configurado para reproduzir o sistema de avaliação de pureza, com base no novo Regulamento Técnico.

O banco de dados do estudo foi organizado no aplicativo *Microsoft® Excel® 2016 MSO*, 64 bits, que também foi utilizado para elaboração das tabelas apresentadas. Para cálculo das medidas de frequência e de associação, assim como das funções relativas à análise de sobrevivência, foi utilizado o programa *STATA®*, versão 13.

O detalhamento das informações apresentadas neste artigo buscou atender recomendações de Sargeant et al. (2009), O'Connor et al. (2010) e O'Connor (2010), para publicação de experimentos com intervenção.

Resultados e discussão

Informações gerais

Os trabalhos de seleção das unidades experimentais e de constituição das coortes foram conduzidos no segundo semestre de 2009, e o seguimento das coortes ocorreu no período de dezembro de 2009 a julho de 2011. As coortes C1 e C2 foram iniciadas simultaneamente nas quatro propriedades rurais participantes do estudo (8/12/2009), enquanto o início da coorte C3 dependeu da disponibilidade de bovinos com idade entre 18 e 24 meses, não vacinados, em cada propriedade participante, o que levou à adoção de diferentes calendários de execução, com início em 2/3/2010 nas propriedades MT-1 e RO, 13/4/2010 na propriedade MT-2 e 25/5/2010 na propriedade MG. No período de seguimento das coortes, cada propriedade rural recebeu entre 30 e 34 inspeções das equipes de campo, com coleta de 25.339 amostras de soro sanguíneo e aplicação de 3.899 doses de vacina contra a FA. O resumo do total de amostras coletadas e processadas, acompanhado dos resultados dos testes laboratoriais utilizados, está disponível na Tabela 2, segundo coorte utilizada.

Tabela 02. Síntese sobre o total de bovinos, amostras coletadas e processadas e doses aplicadas de vacina, segundo resultado laboratorial e coortes

Coorte	Bovinos*	Amostras colhidas e processadas	Doses de vacina	Resultados no sistema ELISA 3ABC/EITB			Falhas** (primeira ocorrência por animal)	
				Negativos	Indeterminados	Positivos	Cenário 1	Cenário 2
C1	397	8.721	1.449	8.653	45	23	13	32
C2	397	8.206	1.378	8.135	57	14	9	39
C3	396	6.043	1.068	5.995	42	6	2	21
CN	80	2.369	-	2.354	13	2	2	7
Total	1.270	25.339	3.895	25.137	157	45	26	99

* Total de bovinos no início das coortes ** resultados considerados na análise deste artigo

Cenário 1 = resultados indeterminados considerados como negativos; Cenário 2 = resultados indeterminados considerados como positivos

A seleção aleatória dos animais para constituição das coortes com intervenção permitiu, para as variáveis idade e sexo, adequada similaridade na composição das amostras por vacina, conforme pode ser observado na Tabela 3 e Figura 2. Para a variável idade, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (resultados na Tabela 3) indica, com nível de significância de 5%, que as amostras por vacina utilizada foram originadas de uma mesma distribuição.

Tabela 03. Informações sobre sexo e idade dos animais selecionados para constituição das coortes com intervenção, ao início do experimento, segundo coorte e vacina utilizada

Coorte	Vacina	Fêmeas					Machos					Total	Teste Kruskal-Wallis para idade (3 graus de liberdade)	
		Bovinos		Idade (meses)			Bovinos		Idade (meses)				X ²	Valor p
		Total	%	Média	Mínima	Máxima	Total	%	Média	Mínima	Máxima			
C1	Vac1	61	61%	2,7	0,7	3,8	39	39%	2,0	0,6	3,2	100	0,427	0,9347
	Vac2	60	60%	2,7	0,9	3,8	40	40%	2,0	0,7	3,2	100		
	Vac3	63	63%	2,7	0,9	3,8	37	37%	2,1	0,7	3,3	100		
	Vac4	65	65%	2,6	0,9	3,8	35	35%	2,0	0,7	3,3	100		
	Total	249	62%	2,7	0,7	3,8	151	38%	2,0	0,6	3,3	400		
C2	Vac1	75	75%	8,7	5,3	12,3	25	25%	6,8	5,3	9,4	100	0,428	0,9344
	Vac2	73	73%	8,8	5,3	12,3	27	27%	7,1	5,3	9,4	100		
	Vac3	68	68%	8,8	5,3	12,1	32	32%	7,1	5,3	9,4	100		
	Vac4	75	75%	8,7	5,3	12,1	25	25%	7,2	5,3	9,4	100		
	Total	291	73%	8,8	5,3	12,3	109	27%	7,1	5,3	9,4	400		
C3	Vac1	86	86%	19,4	16,9	24,1	14	14%	17,5	16,3	19,1	100	1,428	0,6991
	Vac2	86	86%	19,6	16,3	23,8	14	14%	17,9	16,3	19,2	100		
	Vac3	84	84%	19,3	16,9	23,8	16	16%	17,7	16,5	19,7	100		
	Vac4	83	83%	19,5	16,9	23,5	17	17%	17,9	16,3	19,2	100		
	Total	339	85%	19,5	16,3	24,1	61	15%	17,7	16,3	19,7	400		

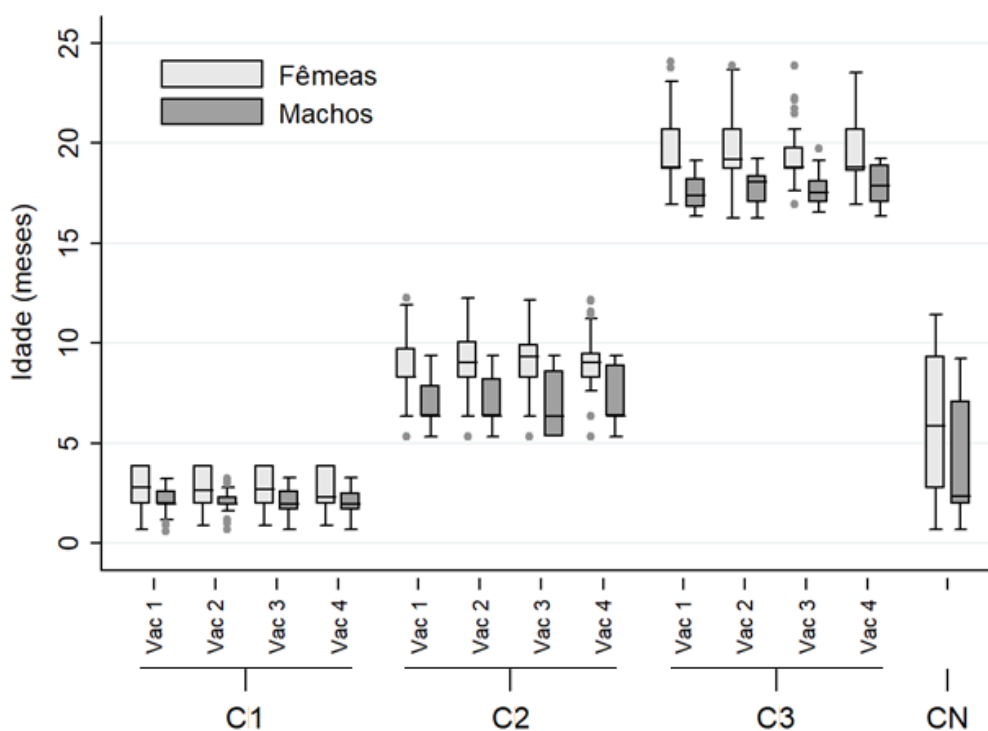


Figura 02. Box plot para covariável idade, segundo sexo, vacina e coorte

Além das amostras oriundas das unidades experimentais, também foram processadas 96 amostras referentes aos soros controle-positivo. Os testes realizados classificaram corretamente 93,8% (90/96) das amostras, destacando que não foram registrados resultados indeterminados. O valor obtido no experimento ficou próximo à estimativa pontual da sensibilidade agregada informada para o sistema de métodos laboratoriais utilizado (94,9%), o que apoia à validação dos resultados obtidos no experimento.

Durante o seguimento das coortes, 45 bovinos foram eliminados do estudo ou censurados antes do término do período de seguimento, representando 3,5% do total previsto de animais. A relação destes animais, acompanhada de informações como número de sangrias consideradas no experimento, está disponível na Tabela 4, segundo coorte, propriedades rurais e causa da eliminação ou censura. Registra-se, também, que não foram realizadas 152 sangrias, devido a não recuperação do animal no dia da coleta ou por problemas na programação das atividades, sendo 19 sangrias na coorte C1, 14 na C2, 31 na C3 e 122 na CN. Especificamente para a coorte C3, devido a problemas na programação de algumas atividades de campo, não foi possível atender à configuração proposta, e o número previsto de animais para o estrato utilizado com objetivo de simular o teste de avaliação de pureza foi reduzido para, aproximadamente, 70 bovinos por vacina.

Em todo o experimento, foram registradas 200 amostras reativas referentes a 99 bovinos, sendo 45 positivas e 155 indeterminadas (não estão incluídos dois bovinos com resultados indeterminados no dia zero de coleta, considerados negativos no cenário 1 e eliminados no cenário 2, conforme demonstrado na Tabela 4). A relação destes 99 bovinos está disponível na Tabela A1 anexa a este artigo, onde estão apresentados tanto os primeiros resultados de cada bovino reagente (falhas), assim como os resultados seguintes, de forma a permitir uma visão geral sobre a persistência de reatividade (multieventos) não avaliada neste artigo.

Um resumo dos resultados por amostra, segundo vacina, CN e número de vacinações, está disponível na Tabela 5, com os dias de observação agrupados em três períodos: inicial (até 154 dias); médio (168 a 308 dias) e final (322 a 532 dias). Em relação ao total de amostras reagentes, tanto para os resultados positivos como indeterminados, pode-se verificar um menor registro de casos na coorte CN, 7% (Pos = 2; Ind = 12) quando comparado aos animais vacinados 93% (Pos = 43; Ind = 143). Quanto à distribuição dos resultados ao longo do período de observação, verifica-se um registro crescente de amostras positivas ou indeterminadas, oriundas principalmente de animais com três ou quatro vacinações. No caso das amostras positivas, 4% foram registradas no período inicial, 20% no período médio; e 76% no período final, sendo 87% em amostras oriundas de animais com três ou mais vacinações. Para as amostras indeterminadas, 26% foram registradas na parte inicial do período de observação; 31% na parte mediana; e 43% ao final do período de observação, com 57% das amostras oriundas de animais com três ou quatro vacinações.

Tabela 04. Relação dos animais eliminados ou censurados antes do término do período de observação, acompanhada do total de sangrias consideradas no estudo, segundo coorte, propriedade rural, tipo e causa de ocorrência

Coorte	Propriedade	Animal	Ocorrência		Data da última observação	Total de sangrias consideradas		
			Tipo	Causa		Cenário 1	Cenário 2	
C1	MG	47	Censurado	Morte	31/8/10	14	14	
		73	Censurado	Morte	2/3/10	5	5	
		80	Censurado	Morte	22/6/10	12	12	
	MT-1	106	Censurado	Morte	13/4/10	7	7	
		163	Eliminado	Aplicação de vacina errada	25/5/10	0	0	
		303	Censurado	Morte	31/8/10	14	14	
	MT-2	220	Censurado	Morte	7/12/10	16	16	
		222	Censurado	Morte	9/11/10	15	15	
		244	Censurado	Morte	13/4/10	7	7	
	RO	341	Censurado	Morte	8/6/10	10	10	
		346	Eliminado	Resultado positivo no dia zero	24/5/11	0	0	
		353	Censurado	Morte	8/6/10	11	11	
		356	Censurado	Morte	12/10/10	15	15	
		370	Censurado	Morte	27/4/10	8	8	
		383	Censurado	Morte	2/3/10	5	5	
		418	Eliminado	Resultado positivo no dia zero	24/5/11	0	0	
		420	Censurado	Roubo	31/8/10	14	14	
	C2	MG	426	Censurado	Roubo	31/8/10	14	14
			665	Censurado	Morte	30/3/10	7	7
			702	Eliminado	Não vacinado no dia zero	24/5/11	0	0
MT-1		736	Censurado	Morte	30/3/10	7	7	
		825	Censurado	Morte	13/4/10	8	8	
		846	Censurado	Morte	13/4/10	8	8	
MT-2		852	Eliminado	Animal não encontrado por longo tempo	2/2/10	0	0	
		875	Eliminado	Morte após primeira colheita	8/12/09	0	0	
		884	Censurado	Morte	16/3/10	6	6	
		888	Censurado	Morte	26/10/10	16	16	
	896	Censurado	Morte	26/10/10	16	16		
	950	Censurado	Morte	17/8/10	14	14		
	951	Censurado	Morte	16/2/10	5	5		
964	Censurado	Morte	16/3/10	6	5			
988	Censurado	Morte	26/10/10	14	14			
RO	1078	Eliminado	Resultado Indeterminado no dia zero	24/5/11	22	0		
C3	MG	1367	Censurado	Morte	20/7/10	4	4	
		1454	Censurado	Morte	8/6/10	5	5	
	MT-1	1483	Eliminado	Não vacinado no dia zero	12/4/11	0	0	
		1560	Eliminado	Aplicação de vacina errada	31/8/10	0	0	
		1567	Eliminado	Aplicação de vacina errada	31/8/10	0	0	
	RO	1642	Censurado	Morte	7/12/10	12	12	
		1674	Eliminado	Resultado positivo no dia zero	11/5/10	0	0	
		1692	Censurado	Morte	7/12/10	12	12	
	CN	MG	26	Censurado	Morte	14/9/10	18	18
		MT-2	920	Censurado	Morte	12/10/10	19	19
RO		338	Censurado	Morte	9/11/10	21	21	
1013		Eliminado	Resultado Indeterminado no dia zero	24/5/11	30	0		

Cenário 1 = resultados indeterminados considerados como negativos; Cenário 2 = resultados indeterminados considerados como positivos

Tabela 05. Distribuição do número de amostras positivas (Pos) e indeterminadas (Ind), segundo vacina, coorte CN e número de vacinações, agrupado nos períodos inicial, médio e final dos dias de observação

CN e Vacinas	Período de observação														Total geral		
	Até 154 dias				168 a 308 dias				322 a 532 dias								
	N° vacinações				N° de vacinações				N° de vacinações				Ind	Pos	Total		
	0	1	2		0	1	2	3	4	0	2	3				4	
CN	1	-	-	-	1	2	-	-	-	10	-	-	-	-	12	2	14
Vac1	-	-	1	6	-	-	-	4	12	4	2	-	-	-	13	11	24
Vac2	-	-	3	8	1	-	-	5	2	1	-	-	-	-	1	6	7
Vac3	-	-	6	11	-	-	-	3	10	-	2	-	-	-	3	5	8
Vac4	-	-	1	3	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-	1	9	10
Total	1	0	11	28	1	2	0	14	28	6	5	0	10	1	31	32	

Coorte CN

Para a coorte CN, considerando apenas os resultados soropositivos como falha (cenário 1), a densidade de incidência (DI) foi de 0,0485 por 1.000 bovinos-dia (2/41.258), durante os 532 dias de observação. No caso do cenário 2, a DI aumentou, de forma significativa (valor-p monocausal = 0,049) quase quatro vezes ao final do período de observação, 0,1762 por 1.000 bovinos-dia (7/39.732). Informações sobre os dados da análise de sobrevivência estão disponíveis na Tabela A2, do anexo, acompanhadas dos resultados para a função $F(t)$, cujas curvas podem ser avaliadas na Figura 3. No cenário 1, a primeira falha foi registrada aos 196 dias de observação, com probabilidade acumulada de ocorrência de falhas aos 532 dias de observação de 2,5% (IC95% 0,6% a 9,75%). Para o cenário 2, a primeira falha foi registrada logo aos 14 dias de observação, com valor $F(t)$ ao final do período de observação igual a 9,0% (IC95% 4,44% a 18,12%), quase quatro vezes maior ao verificado no cenário 1.

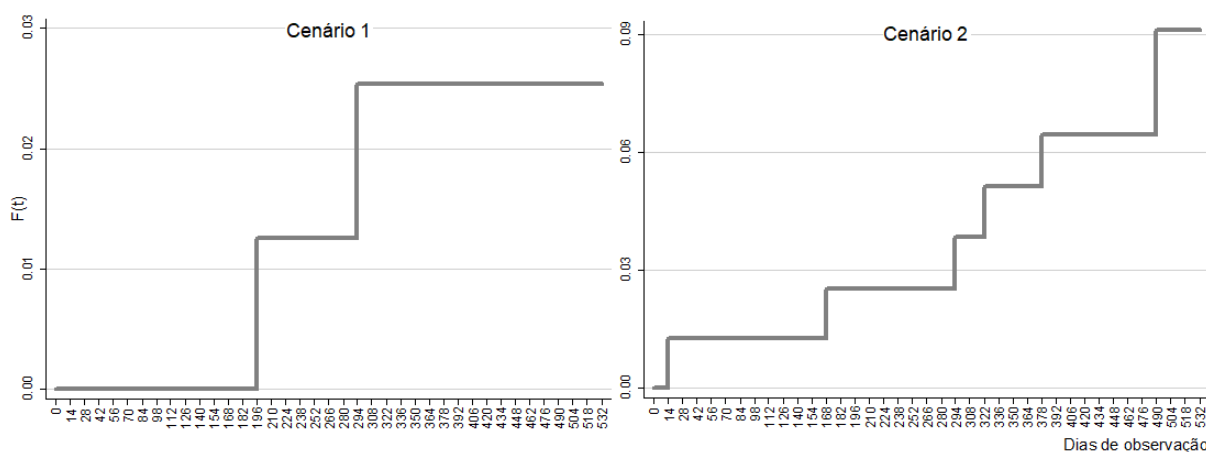


Figura 03. Curvas da função de falha $F(t)$ Kaplan-Meier para a coorte CN, cenários 1 e 2

Análise das vacinas utilizadas

Um resumo dos resultados obtidos, segundo bovinos e amostras avaliadas, está apresentado na Tabela 6, para as coortes com e sem intervenção e segundo a vacina utilizada. Para o contexto de bovinos testados, de forma geral, com base no teste exato de Fisher (monocausal), não foi observada diferença significativa entre as incidências registradas na coorte CN e as coortes com intervenção (C1 + C2 + C3), tanto no cenário 1 (valor-p = 0,5) como no cenário 2 (valor-p = 0,3). Ainda em relação à incidência de bovinos com falhas, também não foram observadas diferenças significativas entre as vacinas utilizadas e entre cada vacina e o CN, independente do cenário considerado.

Tabela 06. Total de bovinos e amostras avaliadas, segundo coorte com e sem intervenção, vacinas utilizadas e resultados obtidos

Coorte	Vacina	Bovinos testados				Amostras testadas			
		Total	Falha*		Total	Resultados**			
			Cenário 1	Cenário 2		Indeterminados	Positivos		
Sem intervenção (CN)	-	80	2 2,5%	8 10,0%	2.347	13 0,6%	2 0,09%		
Com intervenção (C1, C2 e C3)	Vac1	296	9 3,0%	27 9,1%	5.706	45 0,8%	19 0,33%		
	Vac2	300	8 2,7%	28 9,3%	5.753	34 0,6%	15 0,26%		
	Vac3	295	5 1,7%	20 6,8%	5.727	47 0,8%	6 0,10%		
	Vac4	299	2 0,7%	18 6,0%	5.754	18 0,3%	3 0,05%		
	Total	1.190	24 2,0%	93 7,8%	22.940	144 0,6%	43 0,19%		
	Total	1.270	26 2,0%	101 8,0%	25.287	157 0,6%	45 0,18%		

* apenas primeira ocorrência ** considerados todos os resultados (multieventos)

No contexto de amostras testadas, considerando-se todos os resultados obtidos durante o experimento (multieventos), os valores de significância frente ao teste exato de Fisher, monocaudal, segundo diferentes cruzamentos, estão disponibilizados na Figura 4. Não foram encontradas diferenças significativas entre as coortes com e sem intervenção, considerando tanto resultados positivos como positivos e indeterminados. A avaliação entre cada vacina e o CN, demonstrou diferença significativa para a Vac1, em ambos cenários, observando-se valores próximos ao nível de confiança para Vac2 no cenário 1, e para Vac4 no cenário 2. A comparação entre vacinas, revelou diferença significativa das vacinas Vac1 e Vac2 em relação às vacinas Vac3 e Vac4, no cenário 1; e entre a Vac4 em relação às demais vacinas no cenário 2.

Cenário com apenas resultados positivos							Cenário com resultados positivos e indeterminados						
	CN	Vac1	Vac2	Vac3	Vac4	C1 C2 C3		CN	Vac1	Vac2	Vac3	Vac4	C1 C2 C3
CN		0,032	0,091	0,575	0,451	0,199	CN		0,027	0,201	0,125	0,070	0,218
Vac1	0,032		0,295	0,007	0,000	-	Vac1	0,027		0,086	0,171	0,000	-
Vac2	0,091	0,295		0,040	0,004	-	Vac2	0,201	0,086		0,374	0,001	-
Vac3	0,575	0,007	0,040		0,252	-	Vac3	0,125	0,171	0,374		0,000	-
Vac4	0,451	0,000	0,004	0,252		-	Vac4	0,070	0,000	0,001	0,000		-
C1 C2 C3	0,199	-	-	-	-		C1 C2 C3	0,218	-	-	-	-	

Figura 04. Matriz com valores-p obtidos frente ao teste exato de Fisher (monocaudal) para diferentes comparações

Os resultados referentes à análise de sobrevivência, acumulados para as três coortes com intervenção, segundo dia de observação e vacina utilizada, estão resumidos nas Tabelas A3 e A4, do Anexo, respectivamente para os cenários 1 e 2, acompanhados dos valores da função F(t). No dia 406 de observação, verifica-se número expressivo de bovinos censurados devido à interrupção no acompanhamento dos animais da coorte C3, em função de dificuldades operacionais para manutenção e manejo dos bovinos adultos. Resumo dos resultados está disponível na Tabela 7, para os dois cenários considerados. De forma geral, a análise entre as coortes com e sem intervenção revelou RDI=0,87 (IC95%: 0,22 a 7,61; valor-p = 0,39) no cenário 1; e RDI = 0,95 (IC95%: 0,44 a 2,42; valor-p = 0,43) no cenário 2. Independente do

cenário considerado, para as quatro vacinas utilizadas não foram encontradas diferenças significativas ($\alpha=5\%$) para razão de densidade de incidência e para as curvas de sobrevivência em relação à coorte CN. Também foram avaliadas as curvas de sobrevivência entre as vacinas utilizadas e não foram observadas diferenças significativas ao teste de Log-rank ($\alpha=5\%$), com valor-p = 0,16 no cenário 1 e valor-p = 0,23 no cenário 2.

Tabela 07. Informações sobre unidade-tempo, falhas e função acumulativa F(t), por vacina e cenários 1 e 2

Coorte Vacina	Cenário 1									Cenário 2								
	Bovino-tempo	F	DI (x 1000)	Razão densidade de incidência			Log-rank valor-p	Bovino-tempo	F	DI (x 1000)	Razão densidade de incidência			Log-rank valor-p				
				RDI	LI	LS					RDI	LI	LS					
CN	-	41.258	2	0,05	-	-	-	-	-	39.732	7	0,18	-	-	-	-	-	
Intervenção (C1, C2 e C3)	Vac1	140.798	9	0,06	1,32	0,27	12,54	0,39	0,72	135.632	27	0,20	1,13	0,48	3,07	0,40	0,84	
	Vac2	141.148	8	0,06	1,17	0,23	11,30	0,45	0,88	135.954	28	0,21	1,17	0,50	3,17	0,37	0,70	
	Vac3	142.548	5	0,04	0,72	0,12	7,60	0,34	0,67	138.880	20	0,14	0,82	0,33	2,29	0,32	0,67	
	Vac4	143.136	2	0,01	0,29	0,02	3,98	0,13	0,16	140.350	17	0,12	0,69	0,27	1,96	0,20	0,47	

F = falha; DI = densidade de incidência; LI = limite inferior do IC95%; LS = limite superior do IC95%;

Ainda em relação à avaliação das vacinas, os resultados de parte da coorte C3, delineada com objetivo de reproduzir o sistema de avaliação de pureza estabelecido no novo Regulamento Técnico, estão resumidos nas Tabelas 8 e 9. Para o cenário 1, que retrata a regra de decisão utilizada, o aumento em quase quatro vezes o número de bovinos testados por vacina, em relação aos 18 animais previstos no sistema oficial de avaliação, não foi suficiente para detectar resultados soropositivos em todos os testes realizados. Já no cenário 2, para as vacinas Vac2 e Vac3, foi registrado um total de 2 e 3 falhas, respectivamente. Considerando que a probabilidade de resultados soropositivos é muito baixa, para sua detecção, com base na atual metodologia utilizada para avaliação e aprovação das partidas de vacina, exige-se um total de animais inviável do ponto de vista econômico e operacional, o que aponta para necessidade de identificar novos métodos para avaliação de pureza das vacinas.

Tabela 08. Informações sobre a coorte C3 utilizada para simular o sistema de avaliação de pureza das vacinas contra a FA, com respectivo grupo controle negativo (CN), segundo propriedade rural e cenários 1 e 2

Datas			Dias após última vacinação	Cenário 1				Cenário 2			
MG	MT-1 e RO	MT-2		Portaria		CN		Portaria		CN	
				Bovinos	Falhas	Bovinos	Falhas	Bovinos	Falhas	Bovinos	Falhas
25/5/10	2/3/10	13/4/10	0	279	0	60	0	279	0	59	0
8/6/10	16/3/10	27/4/10	14	279	0	60	0	279	2	59	0
22/6/10	30/3/10	11/5/10	28	279	0	80	0	277	0	78	0
6/7/10	13/4/10	25/5/10	42	279	0	80	0	277	0	78	0
20/7/10	27/4/10	8/6/10	14	279	0	80	0	277	0	78	0
3/8/10	11/5/10	22/6/10	28	277	0	80	0	275	3	78	0
				1.672	0	440	0	1.664	5	430	0

Obs.: células destacadas em cinza indicam vacinação

Tabela 09. Resultados de parte da coorte C3 utilizada para simular o sistema de avaliação de pureza das vacinas contra a FA, segundo as vacinas utilizadas e cenários 1 e 2

Dias após última vacinação	Atividade	Cenário 1								Cenário 2							
		Vac1		Vac2		Vac3		Vac4		Vac1		Vac2		Vac3		Vac4	
		Bov	F	Bov	F	Bov	F	Bov	F	Bov	F	Bov	F	Bov	F	Bov	F
0	Vacinação e sangria	69	0	70	0	69	0	70	0	69	0	70	0	70	0	70	0
14	Sangria	69	0	70	0	69	0	70	0	69	0	70	0	70	2	70	0
28	Sangria	69	0	70	0	69	0	70	0	69	0	70	0	68	0	70	0
42	Vacinação e sangria	69	0	70	0	69	0	70	0	69	0	70	0	68	0	70	0
14	Sangria	68	0	70	0	69	0	70	0	69	0	70	0	68	0	70	0
28	Sangria	68	0	70	0	69	0	69	0	68	0	70	2	68	1	69	0
Total		412	0	420	0	414	0	419	0	413	0	420	2	412	3	419	0

Bov = bovinos amostrados; F = falha (resultado soropositivo)

Análise segundo número de vacinações e tempo após última vacinação

Com respeito ao “número de vacinações” (tanto vacinações sistemáticas como reforços), os resultados da análise, considerando-se a avaliação conjunta das coortes C1 e C2, limitada ao intervalo entre vacinações semestrais, estão resumidos na Tabela 10, acompanhados da função F(t) acumulada ao final do período de observação com respectivos IC95%, e do teste de hipótese *Log-rank*.

Para o cenário 1, a análise conjunta das curvas de sobrevivência ficou próxima ao nível de significância estabelecido ($\alpha=5\%$). A análise da razão de densidade de incidência (RDI) mostrou-se significativa para as seguintes relações: N3/N1 (RDI = 5,9; valor-p = 0,024); N4/N1 (RDI = 5,7; valor-p = 0,037); N3/N2 (RDI = 7,6; valor-p = 0,0096); e N4/N2 (RDI = 7,2; valor-p = 0,018). Estes resultados indicam relação direta entre número de vacinações e incidência de resultados soropositivos.

No cenário 2, o resultado do teste *Log-rank* para avaliação das curvas de sobrevivência entre as categorias consideradas não foi significativo ($\alpha=5\%$). Entretanto, na análise da RDI, foram registradas diferenças significativas nas relações das categorias N2, N3 e N4 comparadas à categoria N1, também indicando, neste cenário, uma relação direta entre número de vacinações e o desfecho investigado: RDI N2/N1 = 2,5; valor-p = 0,0209; RDI N3/N1 = 2,4; valor-p = 0,0228; e RDI N4/N1 = 2,4; valor-p = 0,0312. A comparação da RDI entre as categorias N2, N3 e N4 não revelou relação significativa (RDI N3/N2 = 0,95; valor-p = 0,42; RDI N4/N2 = 0,95; valor-p = 0,44; e RDI N4/N3 = 1,0; valor-p = 0,49).

A representação gráfica das curvas da função acumulada F(t) para os cenários avaliados está disponível na Figura 5, e para os valores de F(t) ao final do período de observação, com seus respectivos IC95%, na Figura 6. Considerando-se a medida resumo pontual de F(t) ao final do período de observação, verifica-se, no cenário 1, uma probabilidade de falha para animais com três ou quatro vacinações, cerca de 15 vezes maior quando comparada a bovinos com uma vacinação, e de oito vezes maior quando comparada a bovinos com duas vacinações. No cenário 2, o aumento é de aproximadamente quatro vezes entre bovinos com mais de uma vacinação comparados com bovinos com uma vacinação.

Tabela 10. Resultado da análise de associação entre a variável número de vacinações e o desfecho investigado, segundo cenários 1 e 2

Vacinações	Cenário 1							Cenário 2								
	Bov	Bovinos-tempo	F	DI (x 1000)	F(t)	LI	LS	Log-rank valor-p	Bov	Bovinos-tempo	F	DI (x 1000)	F(t)	LI	LS	Log-rank valor-p
N1	794	66.499	1	0,015	0,001	0,0002	0,009	0,0594	794	66.443	6	0,090	0,009	0,004	0,020	0,1654
N2	789	84.951	1	0,012	0,002	0,0003	0,014		789	83.983	19	0,226	0,039	0,025	0,063	
N3	780	123.405	11	0,089	0,016	0,0086	0,028		780	121.593	26	0,214	0,035	0,024	0,052	
N4	457	82.205	7	0,085	0,015	0,0074	0,032		448	79.484	17	0,214	0,038	0,024	0,061	

Bov = bovinos em risco; F = falha; DI = densidade de incidência; $F_{ac}(t)$ = função de falha acumulada; LI = limite inferior IC95%; LS = limite superior IC95%

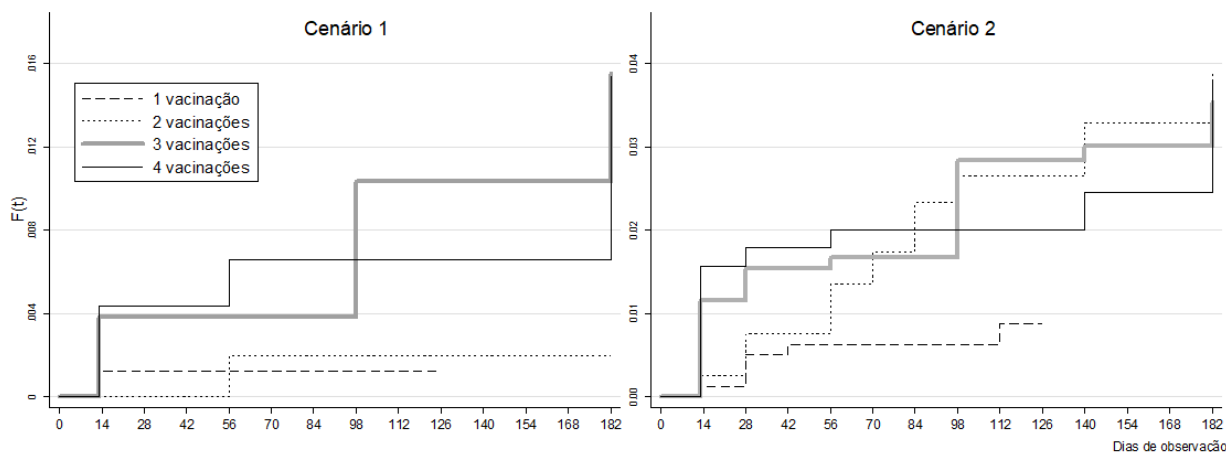


Figura 05. Curvas da função de falha $F(t)$ Kaplan-Meier para a variável número de vacinações, cenários 1 e 2

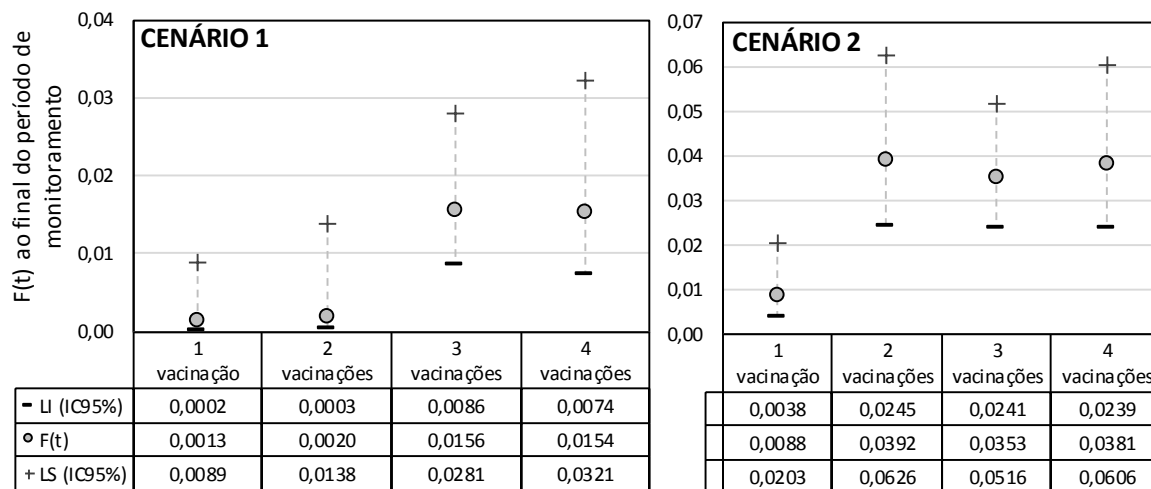


Figura 06. Representação gráfica dos valores de $F(t)$ ao final do período de observação, para a variável número de vacinações, segundo cenários 1 e 2

Quanto à variável “tempo após última vacinação”, os resultados referentes à análise conjunta das coortes C1 e C2, estão resumidos na Tabela 11, segundo cenários 1 e 2, e para os agrupamentos que representam os terços inicial (T1), médio (T2) e final (T3) entre etapas de vacinação semestral. Para o cenário 1 não foram encontradas diferenças significativas para as RDI entre os períodos avaliados. No cenário 2, observa-se uma maior concentração de falhas no T1 (36 falhas, 53% do total), com relação significativa entre os períodos inicial e final (RDI T1/T3 = 1,8; valor-p = 0,028), indicando, aproximadamente, o dobro de incidência nos primeiros 60 dias após vacinação, comparada ao terço final do intervalo entre etapas de vacinação semestral.

Tabela 11. Resultados das coortes C1 e C2, segundo dias após última vacinação e cenários 1 e 2

Intervalo	Cenário 1					Cenário 2				
	Bovino-tempo	Falha	DI (x 1000)	LI IC95%	LS IC95%	Bovino-tempo	Falha	DI (x 1000)	LI IC95%	LS IC95%
T1	147.928	8	0,054	0,027	0,108	146.655	36	0,245	0,177	0,340
T2	91.602	5	0,055	0,023	0,131	90.314	16	0,177	0,109	0,289
T3	117.530	7	0,060	0,028	0,125	114.534	16	0,140	0,086	0,228

DI = densidade de incidência; LI = limite inferior; LS = limite superior

Considerações finais

A execução deste estudo demandou grande esforço operacional e de recursos humanos e financeiros. As ausências de algumas poucas coletas, conforme relatado, são esperadas em trabalhos desta dimensão e não comprometeram a qualidade final dos resultados.

Os resultados obtidos compõem um rico banco de amostras e de informações que estão disponíveis para realização de diferentes análises que extrapolam o escopo deste artigo. Entre as análises possíveis, destacam-se, por exemplo, a avaliação de curvas de imunidade segundo idade dos animais e diferentes esquemas de vacinação, assim como a modelagem temporal da reatividade aos *Diva tests* (curva de reatividade segundo dias pós vacinação) em bovinos submetidos a diferentes esquemas de vacinação, como suporte para a interpretação de resultados de estudos sobre transmissão viral.

Neste momento, limitando-se a um diagnóstico de situação sobre o nível de indução de reatividade contra PNEs provocado por algumas das vacinas utilizadas no país, frente aos testes sorológicos empregados nos estudos de avaliação de transmissão do vírus da FA, o presente trabalho contribuiu com informações sobre as seguintes questões principais:

- i. considerando-se apenas a análise dos resultados soropositivos (cenário 1), de forma geral, as taxas de incidência observadas, ficaram próximas do padrão de especificidade agregada do sistema de métodos laboratoriais utilizado. O experimento aponta para redução da indução de anticorpos contra PNEs pelas vacinas utilizadas, produzidas de acordo com o novo Regulamento Técnico e empregando os procedimentos adotados pelas indústrias produtoras no país para purificação e clarificação das suspensões virais, especialmente quando comparadas às vacinas disponibilizadas até meados dos anos 2000. É importante considerar, em complemento, que o tamanho de amostra utilizado neste experimento, por vacina avaliada, pode não ter sido adequado para detecção dos níveis atuais de indução, com a confiança desejada;
- ii. mesmo utilizando vacinas com reduzida capacidade de estimular a produção de anticorpos contra PNEs, em regiões com comprovada ausência de transmissão viral, submetidas ou não a programas de vacinação massiva e sistemática, são esperados resultados soropositivos nos estudos populacionais para avaliação de transmissão viral, decorrentes tanto de problemas de especificidade dos testes laboratoriais utilizados (particularmente como observado na avaliação

- da coorte CN), como pela própria prática da vacinação (como verificado na avaliação segundo número de vacinações). Neste experimento, mesmo não sendo verificadas diferenças significativas entre as vacinas utilizadas e entre estas e o controle negativo, como observado nos cenários 1 e 2, a análise da característica “número de vacinações” aponta para sua relação direta com a incidência de soropositivos ou indeterminados, o que deve ser considerado na análise dos resultados obtidos nos estudos de avaliação de transmissão viral conduzidos no país;
- iii. quanto à variável “tempo após última vacinação”, nos trabalhos conduzidos no Brasil até 2005, foi observada sua relação indireta com resultados soropositivos (GONÇALVES et al., 2003), condição considerada no delineamento dos estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral, distanciando-se a coleta de amostras em pelo menos 60 dias da última etapa de vacinação. Os resultados obtidos neste experimento, assim como nos mais recentes estudos conduzidos no país, provavelmente como consequência da redução de reatividade induzida pelas vacinas utilizadas, apontam para o menor impacto do tempo de coleta após vacinação sobre a incidência de soropositivos, conforme observado no cenário 1. Entretanto, para o cenário 2, foi registrada concentração significativa de reagentes no período de 60 dias após a última vacinação, justificando-se a recomendação de distanciamento entre vacinação e coleta de amostras nos estudos epidemiológicos; e
- iv. um tema importante abordado neste trabalho refere-se aos resultados indeterminados, para os quais não estão disponíveis informações sobre padrões de reatividade para os testes laboratoriais utilizados. É importante reforçar que no Brasil, nos estudos populacionais para avaliação de transmissão viral, estes resultados indeterminados são investigados utilizando-se da mesma estratégia adotada para os resultados soropositivos, o que reforça a importância sobre a necessidade de melhor conhecimento quanto à expectativa de reatividade a partir da utilização dos *Diva tests*. A incidência de resultados indeterminados verificada no experimento, considerando apenas as coortes C1, C2 e CN, que melhor se aproximam dos estudos epidemiológicos para avaliação de transmissão viral (0,55%; 105/19.101), ficou próxima aos valores obtidos nos últimos estudos de transmissão viral realizados em áreas com vacinação no país, onde o percentual de animais com resultados indeterminados variou entre 0,28% e 0,50% (Moraes et al., 2015; Brasil, 2013, 2016, 2017).

Agradecimentos

Estudos epidemiológicos, como o descrito neste trabalho, somente são possíveis com a participação de número expressivo de profissionais, responsáveis por diferentes atividades de coordenação e execução. Dessa forma, o autor gostaria de reconhecer e agradecer a participação dos profissionais dos serviços veterinários oficiais localizados nos estados envolvidos no trabalho e dos profissionais da rede oficial de laboratórios do Ministério da Agricultura, responsáveis pela realização dos testes laboratoriais.

Referências

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2018: **Instrução Normativa, nº 11, de 18 de Janeiro de 2018**. Ementa: Aprova o Regulamento Técnico para a produção, controle da qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra a febre aftosa. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2017: **Brazil's request to expand the FMD free zone where vaccination is practiced, proposal for recognition of the states of Amapá, Amazonas, Roraima and protection zones of the state of Pará as a FMD free zone where vaccination is practised**. Volume II: Annexes. Brasília, DF. 64 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2016: **Epidemiological study for evaluation of viral transmission in the FMD free zone with vaccination, 2014/2015, final report**. Brasília, DF. 17 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2013: **Request for recognition of the states of Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, and the northern region of the state of Pará, as a FMD free zone with vaccination**. Brasília, DF.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2008: **Instrução Normativa, nº 50, de 23 de setembro de 2008**. Ementa: Aprova o Regulamento Técnico para a produção, controle da qualidade, comercialização e emprego de vacinas contra a febre aftosa. <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2007: **Report submitted to the World Animal Health Organization – OIE, proposing the recognition of the State of Santa Catarina as a FMD free zone where vaccination is not practised**. Brasília, DF. 46 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 1993: **Portaria nº 121, de 29 de março de 1993**. Ementa: Aprovar as Normas para o Combate à Febre Aftosa firmadas pelo Secretário de Defesa Agropecuária, a serem observadas para o controle e a erradicação da febre aftosa em todo Território Nacional.

BROCCHI, E., BERGMANN I. E., DEKKER, A., PATON, D.J., SAMMIN D. J., GREINER M., GRAZIOLI, S., SIMONE, F., YADIN, H., HAAS, B., BULUT, N., MALIRAT, V., NEITZERT, E., GORIS, N., PARIDA, S., SØRENSEN, K. e CLERCQ, K., 2006: Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus **Vaccine**, 24, 6966–6979. doi:10.1016/j.vaccine.2006.04.050.

CAPORALE, V., GIOVANNINI, A. e ZEPEDA, C., 2012: Surveillance strategies for foot and mouth disease to prove absence of disease and absence of viral circulation. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 31(3), 747-759.

CAMERON, A. R. e F. BALDOCK, C., 1998: Two-stage sampling in surveys to substantiate freedom from disease. **Preventive Veterinary Medicine**, 34, 19-30.

CARVALHO, M. S., ANDREOZZI, V. L., CODEÇO, C. T., CAMPOS, D. P., BARBOSA, M. T. S. e SHIMAKURA, S. E., 2013: **Análise de sobrevivência, teoria e aplicações em saúde**. 2. ed. rev. ampl. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 432 p. ISBN: 978-85-7541-216-9.

CLAVIJO, A., SANCHEZ-VAZQUEZ, M. J., BUZANOVSKY, L. P., MARTINI, M., POMPEI, J. C. e COSIVI, O., 2015: Current Status and Future Prospects to Achieve Foot-and-Mouth Disease Eradication in South America. **Transboundary and Emerging Diseases**. doi:10.1111/tbed.12345

CLAVIJO, A., WRIGHT, P. e KITCHING, P., 2004: Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. **The Veterinary Journal**, 167, 9–22. doi:10.1016/S1090-0233(03)00087-X.

CLERCQ, K. e PATON, D., 2009: Interpretation of results of foot and mouth disease surveillance to distinguish between vaccinated and infected cattle. **Proceedings of the First OIE/FAO Global Conference on Foot and Mouth Disease: The Way Towards Global Control**. 24-26 June 2009. Asunción, Paraguay. P 135-140.

DOHOO, I., MARTIN, W. e STRYHN, H., 2010: **Veterinary epidemiologic research**. National Library of Canada Cataloguing in Publication, 2 ed. ISBN 978-0-919013-60-5.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2014: **Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease**. FAO Animal Production and Health Manual n. 17. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-108637-7. 199 p.

FÁVERO, L. P., 2015: **Análise de dados: modelos de regressão com Excel, STATA e SPSS**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1. Ed., 504 p. ISBN 978-85-352-7088-4.

GARLAND, A.J.M. e CLERCQ, K., 2011: Cattle, sheep and pigs vaccinated against foot and mouth disease: does trade in these animals and their products present a risk of transmitting the disease? **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 30 (1), 189-206

GONÇALVES, V. S. P. e MORAES, G. M., 2017: The application of epidemiology in national veterinary services: Challenges and threats in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine** v. 137, Part B, 1 February, p. 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.018>

GONÇALVES, V. S. P., SILVA, A. M. e MORAES, G. M., 2003: **Random Sample Surveys Conducted in Brazil with a View to Substantiating the Expansion of the Free Zone of Foot-And-Mouth Disease where Vaccination is Practised**. **Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics**. Available at www.sciquest.org.nz

GORIS, N., PRAET, N., SAMMIN, D., YADIN, H., PATON, D., BROCCHI, E., BERVENS, D. e DE CLERCQ, K., 2007: Foot-and-mouth disease non-structural protein serology in cattle: use of a Bayesian framework to estimate diagnostic sensitivity and specificity of six ELSIA tests and true prevalence in the field. **Vaccine**, 25, p. 7177-7196.

KLEINBAUM, D. G., SULLIVAN, K. M., e BARKER, N. D., 2007: **A pocket Guide to Epidemiolog**. Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.

KITCHING, R.P, 2002a: Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 21 (3), 531-538.

KITCHING, R. P., 2002b: **Foot and mouth disease diagnostics: requirements for demonstration of freedom from infection.** OIE General Session; 2002. <http://dx.doi.org/10.1016/0264-> <http://www.oie.int/doc/ged/D32.PDF>

LWANGA, S. K. e LEMESHOW, S., 1991: Sample size determination in health studies, a practical manual. **World Health Organization.** 30 p. ISBN 92.4.154405.8.

MARTIN, S. W., SHOUKRI, M. e THORBURN, M. A., 1992: Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, 1, 33-43.

MORAES, G. M., LOPES, P. L., COSTA, E. D. L., SANTOS, B. A., TEIXEIRA, R. C., CARLOS, N. C. A. e GRISI FILHO, J. H., 2015: Estudo soropidemiológico, baseado em risco, para avaliar circulação viral na área proposta para ampliação da zona livre de febre aftosa, 2013, Brasil. **Biológico**, 77(1), 66.

NARANJO, J. e O. COSIVI, 2013: Eradication of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. **Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.** 368, 20120381. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0381>

OIE (World Organisation for Animal Health), 2017: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus), Chapter 2.1.8. Paris, France, 31 p. (NB: Version adopted in May 2012).

OIE (World Organisation for Animal Health), 2015: **Terrestrial Animal Health Code. Twenty-fourth edition.** Paris, France. ISBN 978-92-9044-972-0.

OIE (World Organisation for Animal Health), 2014: **Guide to terrestrial animal health surveillance.** ISBN 978-92-9044-842-6. 108 pp.

OIE (Office International Des Epizooties), 1998: **International Animal Health Code, mammals, birds and bees.** Paris, France, 7^a ed., 507 p.

OIE (Office International Des Epizooties), 1992: **International Animal Health Code, mammals, birds and bees.** Paris, France, 6^a ed., 566 p.

O'CONNOR, A., 2010: Reporting guidelines for primary research: Saying what you did. **Preventive Veterinary Medicine** 97, p. 144–149. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.09.010

O'CONNOR, A.M., SARGEANT, J.M., GARDNER, I.A., DICKSON, J.S., TORRENCE, M.E., DEWEY, C.E., DOHOO, I.R., EVANS, R.B., GRAY, J.T., GREINER, M., KEEFE, G., LEFEBVRE, S.L., MORLEYM, P.S., RAMIREZ, A., SISCHO, W., SMITH, D.R., SNEDEKER, K., SOFOS, J., WARD, M.P. e WILLS, R., 2010. The REFLECT statement: Methods and processes of creating Reporting Guidelines For Randomized Controlled Trials for livestock and food safety. **Preventive Veterinary Medicine**, 93, p. 11–18. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.10.008

OLASCOAGA, R.C.; GOMES I.; ROSENBERG, F.J.; MELLO, P. A.; ASTUDILLO. V. e MAGALLANES N., 1999: **Fiebre Aftosa**. São Paulo: Editora Atheneu, 458 p.

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012a: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa Prueba Confirmatoria, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2012b: **Instructivo de Uso, NCPanaftosa, Prueba Tamiz, Bovino**. Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa. Versión Julio 2012. http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&view=article&id=150&Itemid=235

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa - OPS/OMS), 2011: **Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease – PHEFA, Action Plan 2011-2020**. Approved Document – 15-12-2010. 46 p. <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/PHEFA-PlanAccion-2011-2020ing.pdf>

PANAFTOSA (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa – OPS/OMS), 2000: Fiebre aftosa, instrumentos seroepidemiológicos para evaluar actividad viral: sistema para detección de anticuerpos contra antígenos no capsidales del virus de la fiebre aftosa. **Serie de Manuales Ditácticos**, PANAFOTSA, RJ. n. 16, 62 p.

PARTHIBAN, A. B. R., MAHAPATRA, M., GUBBINS, S. e PARIDA, S., 2015: Virus Excretion from Foot-And- Mouth Disease Virus Carrier Cattle and Their Potential Role in Causing New Outbreaks. **PLoS ONE** 10(6): e0128815. doi:10.1371/journal.pone.0128815

PATON, D.J., DE CLERCQ, K. e DEKKER, A., 2004: **Post-vaccinal Serosurveillance for FMD: A European Perspective on Progress and Problems**, <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/docs/greece04/App76.pdf>.

REVISÃO da política e estratégias de combate à febre aftosa implantadas pelo Projeto de Controle das Doenças dos Animais, 1992: Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agraria. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. 34 p.

ROSENBERG, F. J. e MELLO, A. P., 1974: Portadores de virus aftoso. Proceso terminal de la infección o eslabón intermedio en la cadena epidemiológica de la enfermedad? **Bol Cent Panamer Fiebre Aftosa**; 13-16: 50-60.

SARAIVA V. e GEALE D., 2008: **The Hemispheric Program for the Eradication of Foot-and-Mouth Disease [Plan Hemiférico de Erradicación de Fiebre Aftosa (PHEFA)]: Successes and Challenges**. In: The Global control of FMD - Tools, ideas and ideals. Rome: FAO. Appendix 6

SARGEANT, J. M., ELGIE, R., VALCOUR, J., SAINT-ONGE, J., THOMPSON, A., MARCYNUK, P. e SNEDEKER, K., 2009: Methodological quality and completeness of reporting in clinical trials conducted in livestock species. **Preventive Veterinary Medicine**, 91, p 107–115. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.06.002

STENFELDT, C., ESCHBAUMER, M., REKANT, S. I., PACHECO, J. M., SMOLIGA, G. R., HARTWIG, E. J., RODRIGUEZ, L. L. e ARZTA J., 2016: The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. **Journal of Virology**, Volume 90 Number 14, p. 6344 – 6364. <http://jvi.asm.org/> on November 23, 2017 by guest.

SUTMOLLER, P. e OLASCOAGA R. C., 2002: Unapparent foot and mouth disease infection (sub-clinical infections and carriers): implications for control. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 21 (3), 519-529.

TENZIN, DEKKER A., VERNOOIJ H., BOUMA A. e STEGEMAN A., 2008: Rate of foot-and-mouth disease virus transmission by carriers quantified from experimental data. **Risk Analysis**, Vol. 28, No. 2, DOI: 10.1111/j.1539-6924.2008.01020.x.

UTTENTHAL, A., PARIDA, S., RASMUSSEN, T. B., PATON, D. J., HAAS, B. e DUNDON, W. G., 2010: Strategies for differentiating infection in vaccinated animal (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. **Expert Rev. Vaccines** 9 (1), 73-87.

WICKHAM, H. e BRYAN, J., 2017: readxl: Read Excel Files. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>

WTO (World Trade Organization), 1995: **Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures**. World Trade Organization, https://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/15-sps.pdf.

ZILLER, M., SELHORST, T., TEUFFERT, J., KRAMER, M. e SCHLÜTER, H., 2002: Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. **Preventive Veterinary Medicine**, 52, 333–343.

ANEXOS

Tabela A1. Relação dos bovinos com resultados indeterminados ou positivos durante o período de observação

Os resultados positivos estão representados pela letra “P” e os indeterminados pela letra “I”, ambos seguidos do número de vacinações dos animais no dia de observação. As células marcadas em preto representam os resultados considerados como falha no cenário 1, e as células em cor cinza, como falha no cenário 2.

Tabela A2. Informações sobre dados de sobrevivência para a coorte CN, segundo cenários 1 e 2.

Tabela A3. Informações sobre bovinos avaliados, falhas, censuras e F(t) por vacina e dia de observação, cenário 1

Tabela A4. Informações sobre bovinos em risco (Bov), falhas (F), censuras (C) e F(t) por vacina e dia de observação, cenário 2

Tabela A2. Informações sobre dados de sobrevivência para a coorte CN, segundo cenários 1 e 2.

Dias de observação	Cenário 1							Cenário 2						
	Bovinos		Falha	Censura	F(t)	IC95%		Bovinos		Falha	Censura	F(t)	IC95%	
	Em risco	Amostrados				Li	LS	Em risco	Amostrados				Li	LS
0	0	80	0	0	0,0000	-	-	0	79	0	0	0,0000	-	-
14	80	80	0	0	0,0000	-	-	79	79	1	0	0,0127	0,0018	0,0865
28	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
42	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
56	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
70	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
84	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
98	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
112	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
126	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
140	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
154	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	0	0	0,0127	0,0018	0,0865
168	80	80	0	0	0,0000	-	-	78	78	1	0	0,0253	0,0064	0,0975
182	80	80	0	0	0,0000	-	-	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
196	80	80	1	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
210	79	20	0	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	20	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
224	79	79	0	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
238	79	79	0	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
252	79	79	0	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
266	79	79	0	0	0,0125	0,0018	0,0854	77	77	0	0	0,0253	0,0064	0,0975
280	79	78	0	1	0,0125	0,0018	0,0854	77	76	0	1	0,0253	0,0064	0,0975
294	78	39	1	0	0,0253	0,0064	0,0975	76	37	1	0	0,0383	0,0125	0,1141
308	77	76	0	1	0,0253	0,0064	0,0975	75	74	0	1	0,0383	0,0125	0,1141
322	76	76	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	74	74	1	0	0,0513	0,0196	0,1310
336	76	75	0	1	0,0253	0,0064	0,0975	73	72	0	1	0,0513	0,0196	0,1310
350	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	72	72	0	0	0,0513	0,0196	0,1310
364	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	72	72	0	0	0,0513	0,0196	0,1310
378	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	72	72	1	0	0,0645	0,0273	0,1481
392	75	19	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	71	19	0	0	0,0645	0,0273	0,1481
406	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	71	71	0	0	0,0645	0,0273	0,1481
420	75	19	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	71	19	0	0	0,0645	0,0273	0,1481
448	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	71	71	0	0	0,0645	0,0273	0,1481
490	75	75	0	0	0,0253	0,0064	0,0975	71	71	2	0	0,0908	0,0444	0,1812
532	75	75	0	75	0,0253	0,0064	0,0975	69	69	0	69	0,0908	0,0444	0,1812

Bovinos em risco = total da coorte inicial menos falha e censura; Bovinos amostrados = animais com coleta de amostras no dia de observação
 Cenário 1 = resultados indeterminados considerados como negativos; Cenário 2 = resultados indeterminados considerados como positivos

Tabela A3. Informações sobre bovinos avaliados, falhas, censuras e F(t) por vacina e dia de observação, cenário 1

Dias	Vac1							Vac2							Vac3							Vac4						
	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS
0	0	296	0	0	0,000	-	-	0	300	0	0	0,000	-	-	0	295	0	0	0,000	-	-	0	299	0	0	0,000	-	-
14	296	296	0	0	0,000	-	-	300	300	1	0	0,003	0,0005	0,023	295	294	0	0	0,000	-	-	299	298	0	0	0,000	-	-
28	296	296	0	0	0,000	-	-	299	299	0	0	0,003	0,0005	0,023	295	295	0	0	0,000	-	-	299	298	0	0	0,000	-	-
42	296	266	0	0	0,000	-	-	299	269	0	0	0,003	0,0005	0,023	295	266	0	0	0,000	-	-	299	269	0	0	0,000	-	-
56	295	294	0	1	0,000	-	-	299	298	0	0	0,003	0,0005	0,023	295	295	0	0	0,000	-	-	299	297	0	0	0,000	-	-
70	294	167	0	1	0,000	-	-	298	169	0	0	0,003	0,0005	0,023	295	165	0	0	0,000	-	-	297	168	0	0	0,000	-	-
84	294	98	0	0	0,000	-	-	298	99	0	1	0,003	0,0005	0,023	293	99	0	0	0,000	-	-	297	99	0	1	0,000	-	-
98	294	196	0	0	0,000	-	-	298	198	1	0	0,007	0,0017	0,026	293	194	0	2	0,000	-	-	297	196	0	1	0,000	-	-
112	294	196	0	0	0,000	-	-	296	193	0	1	0,007	0,0017	0,026	293	195	0	0	0,000	-	-	296	196	0	1	0,000	-	-
126	293	146	0	1	0,000	-	-	293	144	0	3	0,007	0,0017	0,026	293	146	0	0	0,000	-	-	296	148	0	0	0,000	-	-
140	293	293	0	0	0,000	-	-	293	292	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	293	0	0	0,000	-	-	295	295	0	1	0,000	-	-
154	293	146	0	0	0,000	-	-	293	143	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	146	0	0	0,000	-	-	295	148	0	0	0,000	-	-
168	293	68	0	0	0,000	-	-	292	69	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	69	0	0	0,000	-	-	295	68	0	0	0,000	-	-
182	293	291	0	0	0,000	-	-	292	292	0	1	0,007	0,0017	0,026	293	293	0	0	0,000	-	-	294	293	1	1	0,003	0,000	0,024
196	292	96	0	1	0,000	-	-	292	99	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	98	0	0	0,000	-	-	293	97	0	0	0,003	0,000	0,024
210	292	29	0	0	0,000	-	-	292	30	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	29	0	0	0,000	-	-	293	29	0	0	0,003	0,000	0,024
224	292	261	0	0	0,000	-	-	292	261	0	0	0,007	0,0017	0,026	293	263	0	0	0,000	-	-	293	264	0	0	0,003	0,000	0,024
238	290	195	1	0	0,003	0,0005	0,024	291	193	0	0	0,007	0,0017	0,026	292	194	0	0	0,000	-	-	293	196	0	0	0,003	0,000	0,024
252	289	166	1	0	0,007	0,0017	0,027	290	163	0	1	0,007	0,0017	0,026	292	165	0	0	0,000	-	-	293	165	0	0	0,003	0,000	0,024
266	288	94	1	2	0,010	0,0033	0,032	290	96	2	1	0,014	0,0051	0,036	292	98	0	1	0,000	-	-	291	96	0	0	0,003	0,000	0,024
280	287	192	0	0	0,010	0,0033	0,032	288	193	0	0	0,014	0,0051	0,036	292	194	0	0	0,000	-	-	290	193	0	2	0,003	0,000	0,024
308	285	92	0	0	0,010	0,0033	0,032	287	94	0	0	0,014	0,0051	0,036	292	97	0	0	0,000	-	-	290	96	0	1	0,003	0,000	0,024
322	285	218	2	2	0,017	0,0072	0,041	287	219	0	1	0,014	0,0051	0,036	292	222	0	0	0,000	-	-	290	218	1	0	0,007	0,002	0,027
336	283	27	0	0	0,017	0,0072	0,041	286	26	0	1	0,014	0,0051	0,036	292	30	0	0	0,000	-	-	289	29	0	0	0,007	0,002	0,027
350	283	64	0	0	0,017	0,0072	0,041	285	66	1	0	0,017	0,0071	0,040	292	68	1	0	0,003	0,0005	0,024	289	67	0	0	0,007	0,002	0,027
364	283	279	2	2	0,024	0,0116	0,050	284	280	0	3	0,017	0,0071	0,040	291	285	0	5	0,003	0,0005	0,024	289	281	0	6	0,007	0,002	0,027
378	279	62	0	0	0,024	0,0116	0,050	282	65	0	0	0,017	0,0071	0,040	286	65	0	0	0,003	0,0005	0,024	283	65	0	0	0,007	0,002	0,027
406	279	184	0	94	0,024	0,0116	0,050	282	184	2	98	0,024	0,0115	0,050	286	191	3	93	0,014	0,0052	0,037	283	193	0	90	0,007	0,002	0,027
448	185	183	0	0	0,024	0,0116	0,050	182	182	0	0	0,024	0,0115	0,050	190	189	0	0	0,014	0,0052	0,037	193	193	0	0	0,007	0,002	0,027
490	185	184	0	1	0,024	0,0116	0,050	182	181	0	1	0,024	0,0115	0,050	190	188	0	1	0,014	0,0052	0,037	193	191	0	1	0,007	0,002	0,027
532	184	186	2	182	0,035	0,0180	0,067	181	182	1	180	0,029	0,0146	0,059	189	189	1	188	0,019	0,0079	0,046	192	191	0	192	0,007	0,002	0,027

Bov¹= bovinos sob risco; Bov² = bovinos avaliados no dia de observação; F = falhas, C = censura; LI = limite inferior do IC95%; LS = limite superior do IC95%

Tabela A4. Informações sobre bovinos em risco (Bov), falhas (F), censuras (C) e F(t) por vacina e dia de observação, cenário 2

Dias	Vac1							Vac2							Vac3							Vac4						
	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS	Bov ¹	Bov ²	F	C	F(t)	LI	LS
0	0	296	0	0	0,000	-	-	0	300	0	0	0,000	-	-	0	295	0	0	0,000	-	-	0	298	0	0	0,000	-	-
14	296	296	0	0	0,000	-	-	300	300	1	0	0,003	0,0005	0,023	295	294	2	0	0,007	0,002	0,027	298	297	0	0	0,000	-	-
28	296	296	1	0	0,003	0,0005	0,024	299	299	2	0	0,010	0,0032	0,031	293	293	0	0	0,007	0,002	0,027	298	297	0	0	0,000	-	-
42	295	265	0	0	0,003	0,0005	0,024	297	267	1	0	0,013	0,0050	0,035	293	264	0	0	0,007	0,002	0,027	298	268	0	0	0,000	-	-
56	294	293	0	1	0,003	0,0005	0,024	296	295	1	0	0,017	0,0070	0,040	293	293	0	0	0,007	0,002	0,027	298	296	1	0	0,003	0,0005	0,024
70	293	166	0	1	0,003	0,0005	0,024	294	165	3	0	0,027	0,0134	0,053	293	164	2	0	0,014	0,005	0,036	295	167	1	0	0,007	0,0017	0,027
84	293	98	0	0	0,003	0,0005	0,024	291	99	0	1	0,027	0,0134	0,053	290	99	0	0	0,014	0,005	0,036	294	99	0	1	0,007	0,0017	0,027
98	293	195	1	0	0,007	0,0017	0,027	291	191	1	0	0,030	0,0157	0,057	290	191	0	1	0,014	0,005	0,036	294	193	0	1	0,007	0,0017	0,027
112	292	194	1	0	0,010	0,0033	0,031	289	188	1	1	0,033	0,0181	0,061	290	195	1	0	0,017	0,007	0,040	293	194	0	1	0,007	0,0017	0,027
126	290	145	1	1	0,014	0,0051	0,036	285	142	0	3	0,033	0,0181	0,061	289	145	0	0	0,017	0,007	0,040	293	147	1	0	0,010	0,0033	0,031
140	289	289	1	0	0,017	0,0071	0,040	285	284	1	0	0,037	0,0205	0,065	289	289	1	0	0,020	0,009	0,045	291	291	1	1	0,014	0,0051	0,036
154	288	144	0	0	0,017	0,0071	0,040	284	141	0	0	0,037	0,0205	0,065	288	145	1	0	0,024	0,011	0,049	290	146	0	0	0,014	0,0051	0,036
168	288	68	0	0	0,017	0,0071	0,040	283	69	0	0	0,037	0,0205	0,065	287	67	0	0	0,024	0,011	0,049	290	68	0	0	0,014	0,0051	0,036
182	288	286	2	0	0,024	0,0114	0,049	283	283	1	1	0,040	0,0230	0,070	287	287	0	0	0,024	0,011	0,049	289	288	1	1	0,017	0,0071	0,040
196	285	95	1	1	0,027	0,0137	0,054	282	99	0	0	0,040	0,0230	0,070	287	96	1	0	0,027	0,014	0,054	288	96	1	0	0,020	0,0092	0,045
210	284	29	0	0	0,027	0,0137	0,054	282	30	1	0	0,044	0,0256	0,074	286	29	0	0	0,027	0,014	0,054	287	28	0	0	0,020	0,0092	0,045
224	284	253	1	0	0,031	0,0161	0,058	281	251	1	0	0,047	0,0281	0,078	286	256	1	0	0,031	0,016	0,058	287	259	0	0	0,020	0,0092	0,045
238	281	189	2	0	0,038	0,0210	0,067	279	181	1	0	0,050	0,0307	0,082	284	189	0	0	0,031	0,016	0,058	287	191	0	0	0,020	0,0092	0,045
252	279	159	1	0																								

