



KELLY CRISTINA DE SOUZA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA -
LFDA (CAMPINAS – SP)**

**LAVRAS - MG
2023**

KELLY CRISTINA DE SOUZA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE
DEFESA AGROPECUÁRIA - LFDA (CAMPINAS – SP)**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof^a Dr^a Maria Raquel Isnard Moulin
Orientadora

**LAVRAS - MG
2023**

KELLY CRISTINA DE SOUZA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE
DEFESA AGROPECUÁRIA - LFDA (CAMPINAS – SP)**

**SUPERVISED INTERNSHIP CARRIED OUT AT THE FEDERAL AGRICULTURAL
DEFENSE LABORATORY - LFDA (CAMPINAS – SP)**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 17 de julho de 2023.
Profª Drª Maria Raquel Isnard Moulin UFLA
Profª Drª Ana Paula Peconick UFLA
M.V. Blenda Araujo Martins Ferreira UFLA

Profª Drª Maria Raquel Isnard Moulin
Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser tão bom comigo e se fazer presente nos momentos mais difíceis.

À minha família, em especial à minha mãe, Fátima, que é meu exemplo de força e minha inspiração para tudo nessa vida. Ao meu irmão, Marcus, pelo apoio de sempre e à minha cunhada Raquel, pelos inúmeros áudios que me confortavam e amparavam durante toda a graduação.

Ao meu namorado, Matheus, por ser meu companheiro de vida e por acreditar em mim sempre.

Às minhas amigas, que foram um presente que a UFLA me deu, Lidiane Bastos, Lidiane Estêvão, Têssia e Jéssica, obrigada pelas risadas e pelos momentos que passamos juntas nesses cinco anos, vocês deixaram essa caminhada mais leve.

Às minhas amigas Hérica, Malu e Isa, que foram minha família de Lavras, obrigada pelos conselhos e pelas risadas na cozinha.

Aos meus amigos Lucas, Juliana, Larissa e Fernanda, que mesmo à distância sempre me apoiaram e se fizeram presentes nessa caminhada.

Ao núcleo de estudos NEVEC, por todo aprendizado, crescimento profissional e amizades que construímos.

Ao laboratório LISASC, pelo trabalho em equipe e por despertarem em mim a paixão por fazer ciência.

À minha orientadora, Maria Raquel, por todo apoio e orientação desde o NEVEC, sou imensamente grata por ter me ajudado em toda essa etapa da minha formação.

A todos os professores, servidores e funcionários da UFLA, sem o trabalho e a dedicação de vocês nada disso seria possível.

Ao LFDA-SP, em especial aos profissionais do CPB, que me acolheram nos três meses de estágio, obrigada por todo aprendizado, vocês foram essenciais para que eu concluísse minha formação.

Aos meninos da República, por me acolherem na casa de vocês durante esse período.

Aos animais de laboratório, pela imensa contribuição no desenvolvimento científico.

RESUMO

A disciplina PRG 107 - Estágio supervisionado é dedicada ao último período da graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras. Possui 408h destinadas às atividades práticas e 68h de atividades teóricas, relacionadas ao desenvolvimento do relatório de estágio. A parte prática foi desenvolvida no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Campinas, São Paulo. O período de estágio foi de 23 de março a 08 de julho de 2023, em que se pôde acompanhar testes vacinais realizados a fim de comprovar a eficácia e segurança de vacinas antirrábicas inativadas e vacinas atenuadas contra Doença de Gumboro, Doença de Newcastle e Bronquite Infecciosa das galinhas. Também se elucidou a questão do bem-estar dos animais de laboratório, principalmente dos roedores, que são os mais utilizados na pesquisa. Foi possível constatar que apesar da utilização de técnicas que minimizem o estresse dos animais e um manejo adequado, não há plena garantia do seu bem-estar durante a realização dos testes. A experiência de estágio é fundamental para consolidar todos os conhecimentos obtidos durante a graduação, além de aprimorar as relações interpessoais e permitir o aprofundamento das diversas áreas de atuação da Medicina Veterinária, como em Saúde Única.

Palavras-chave: Medicina Veterinária. Defesa Agropecuária. Testes vacinais. Bem-estar animal. Saúde Única.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Raiva.....	7
1.2	Doenças de aves.....	8
1.3	Vacinação	10
1.4	Objetivos do estágio e Divisão do tempo.....	12
2	ESTÁGIO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE CAMPINAS.....	13
2.1	Descrição do local de estágio.....	13
2.2	Descrição das atividades desenvolvidas.....	14
2.2.1	Teste NIH.....	14
2.2.2	Produção de vírus rábico	18
2.2.3	FAVN.....	19
2.2.4	Teste de esterilidade	19
2.2.5	Teste de inocuidade de cobaias.....	20
2.2.6	Teste de vírus residual.....	20
2.2.7	Titulação de vacinas aviárias.....	21
2.2.8	Teste de inocuidade em aves	22
2.2.9	Visita ao biotério do LFDA-SP.....	23
3	BEM-ESTAR DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO	26
3.1	Revisão de literatura	26
3.2	Bem-estar de roedores nos laboratórios de experimentação animal.....	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Raiva

A raiva é uma zoonose conhecida há mais de 4000 anos, mas a descoberta do agente viral responsável pela doença só ocorreu em 1880 por Louis Pasteur (SINGH, 2017). O vírus pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus*. É envelopado, tem formato de bala e tamanho de 75 nm de diâmetro por 100-300 nm de comprimento (TAKAYAMA, 2008). A principal forma de transmissão ocorre por mordedura de animais infectados, mas também pode ocorrer via inalação de aerossóis em locais com alta carga viral, por transplante de órgãos e córnea e contaminação de mucosas ou feridas abertas com saliva de animais infectados, porém, são casos mais raros (SINGH, 2017). Após a infecção e o desenvolvimento dos sinais clínicos, aproximadamente 100% dos pacientes vêm à óbito, pois a doença cursa com encefalomielite fatal e não há tratamento, sendo, portanto, altamente letal. O período de incubação é muito variável, dependendo, principalmente, da concentração viral inoculada e da distância entre a via de entrada e o sistema nervoso central. Em humanos, varia entre duas a 12 semanas, podendo chegar a seis anos em alguns casos. Já em cães, varia entre três a oito semanas podendo chegar até seis meses; e em herbívoros varia de 30 a 90 dias. Durante esse período, o vírus se propaga ao redor do local de entrada pelas células musculares e invade o sistema nervoso periférico, migrando até chegar ao sistema nervoso central (TAKAYAMA, 2008). Ao chegar no SNC, há a migração neuronal centrífuga, em que o vírus infecta os neurônios eferentes e chega às glândulas salivares, sendo eliminado na saliva.

Existem vários genótipos conhecidos, mas a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) consideram a doença somente a causada pelo genótipo I (vírus clássico de raiva - RABV). Dentro desse genótipo, há quatro variantes, sendo as mais comuns a variante 2 e a 3. A variante 2 é adaptada ao cão, sendo a mais importante para a saúde pública; já a variante 3 é adaptada aos morcegos hematófagos, muito recorrentes na América Latina nas espécies *Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*. Há também a variante 4, adaptada ao morcego *Tadarida brasiliensis*, espécie comum no Brasil e que, apesar de ser frugívoro e insetívoro, tem seu comportamento alterado com a infecção e pode transmitir a doença por mordedura. A denominada raiva urbana geralmente está associada à variante 2 e é transmitida pelo cão; enquanto a raiva dos herbívoros (rural) está mais associada à variante 3, transmitida pelos morcegos (ITO, 2008).

Estima-se que cerca de 59 mil pessoas são atingidas pela raiva anualmente, ocorrendo principalmente em países da Ásia e África (OMS, 2013). Apesar desse número, a incidência da doença tem diminuído a nível continental, muito provavelmente devido à vacinação em larga escala de cães e gatos. No Brasil, em 2002, foram relatados 720 casos, enquanto em 2022 somente 16 casos nesses animais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Além da utilização de vacinas, a cooperação técnica entre o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento atrelados à melhoria no acesso à profilaxia da doença também foram imprescindíveis na diminuição dos casos no Brasil (VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019). Em relação ao ciclo urbano da doença, o manejo e vacinação de cães e gatos são essenciais principalmente em países como o Brasil, que possui uma das maiores populações de cães do mundo, com cerca de 52,2 milhões de animais nos lares (VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019; IBGE, 2013). A implementação de medidas de manejo populacional de cães e gatos, como a castração e a educação em guarda-responsável também auxiliaram na diminuição da incidência da doença (WANDELER; BINGHAM; MESLIN, 2013).

1.2 Doenças de aves

O Brasil é referência mundial na produção de frangos, sendo o segundo maior produtor em 2022, de acordo com dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). O país é líder na exportação, em que os destinos principais são China e Emirados Árabes Unidos (ABPA, 2023). Esse comércio é muito importante por movimentar uma grande cadeia econômica, além de contribuir para a segurança alimentar da população, por isso, é essencial que os animais tenham bom estado de saúde (GOVERNO FEDERAL, 2022). Entre as doenças que podem comprometer a sanidade das aves estão a Doença de Newcastle, a Bronquite Infecciosa das galinhas e a Doença de Gumboro.

A Doença de Newcastle é uma das doenças que tem controle oficial pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do MAPA pelo seu elevado risco de impacto econômico para o país em um caso de surto. A doença é causada por um vírus da família Paramyxoviridae, subfamília Paramyxovirinae e gênero *Avulavirus*, classificado como paramixovirus aviário 1 (APMV1, Avian Paramyxovirus 1 - paramixovirus aviário 1). O vírus é envelopado e sua transmissão se dá de forma horizontal, através da inalação de aerossóis respiratórios ou contato com fezes de animais infectados (MARTINS; ECCO, 2015). Trata-se de uma doença que integra a lista de doenças infecciosas de notificação obrigatória da Organização Mundial de

Saúde Animal (OIE) (OLIVEIRA JUNIOR et al, 2003). Além do risco econômico que ela pode causar, também há riscos para a saúde pública, visto que é uma zoonose, porém, costuma ser transmitida apenas para os trabalhadores que lidam diretamente com os animais, ou seja, é ocupacional. As estirpes patogênicas podem causar distúrbios em vários sistemas, principalmente o respiratório, gastrointestinal e nervoso central. Já as estirpes não patogênicas (lentogênicas) são muito utilizadas para a produção de vacinas. A doença é exótica na avicultura industrial brasileira devido às ações do PNSA, que incluem normas de biossegurança, vacinação e eutanásia de aves doentes após confirmação laboratorial. A vacinação sistemática é feita em todas as aves reprodutoras, com exceção de aves livres de patógenos especificados ou *Specific Pathogen Free* (SPF), de postura comercial e aves ornamentais, no primeiro dia de vida (MARTINS; ECCO, 2015).

Outra doença importante na avicultura industrial brasileira é a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), doença altamente contagiosa causada pelo vírus *Gammacoronavirus*, família Coronaviridae, ordem Nidovirales. Trata-se de um vírus envelopado, de genoma de RNA de fita simples e que possui grande diversidade genética e antigênica, aspecto que dificulta a eficiência vacinal. Assim como a Doença de Newcastle, sua transmissão se dá principalmente via aerossóis respiratórios e por isso é recorrente em granjas densamente povoadas principalmente por animais de diferentes idades. Causa grande impacto econômico, por aumentar a mortalidade dos animais, levar a perdas em desempenho produtivo, infertilidade e facilitar a ocorrência de infecções secundárias. A BIG pode atingir vários sistemas, como o reprodutor, gastrointestinal e principalmente o respiratório. A vacinação sozinha não é um método de controle eficiente, devido à alta capacidade de mutação do vírus; por isso, é essencial que também se faça a uniformização dos lotes na granja por idade e a vacinação de todos os animais em data única (MARTINS et al., 2015).

Outra doença de alta morbidade é a Doença de Gumboro ou Doença Infecciosa Bursal, uma das principais doenças a comprometer a imunocompetência das aves por ser capaz de atingir os linfoblastos B. Estes são precursores dos plasmócitos, que são os principais responsáveis pela produção de anticorpos. A doença é causada pelo vírus da doença infecciosa bursal (IBDV), pertencente à família Birnaviridae, sendo não envelopado e tendo genoma RNA de fita dupla em dois segmentos. A transmissão também é horizontal, mas ocorre principalmente pela via fecal-oral ou pela inalação de aerossóis fecais. A doença causa lesões na bolsa cloacal, nos rins, intestinos e vasos sanguíneos dos músculos esqueléticos. Assim como no caso da BIG, somente a vacinação não é eficiente para o controle da doença, sendo necessária a adoção de medidas rigorosas de biossegurança nas granjas e a uniformização do manejo com

idade única por núcleo, a fim de permitir a vacinação simultânea de todos os animais. A vacinação deve ser precoce, no 18º dia de incubação ou no primeiro dia de vida. É importante destacar que já ocorreram casos de infecção pela doença com o uso de vacinas pouco atenuadas (MARTINS et al., 2015).

1.3 Vacinação

Como importante medida de controle das doenças supracitadas, tem-se a vacinação dos animais como fundamental na garantia de sua saúde e da saúde pública. Existem diversos tipos de vacina utilizados, como as inativadas, atenuadas, de subunidade, com vetor recombinante e de ácidos nucléicos.

Em relação à raiva, a vacinação de cães e gatos é o que mais contribui para o controle da doença em animais e conseqüentemente nos seres humanos (INSTITUTO PASTEUR, 1999). O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) também recomenda como parte das atividades de prevenção a vacinação de herbívoros domésticos em regiões endêmicas.

As primeiras a serem utilizadas para o controle da raiva e ainda amplamente recomendadas pela sua segurança são as vacinas inativadas. Essas vacinas, conhecidas como inativadas clássicas Fuenzalida & Palácios, inicialmente eram feitas a partir da replicação do vírus em tecido nervoso de animais, principalmente de carneiros. Entretanto, após a ocorrência de reações adversas nos animais e indivíduos vacinados, a OMS recomendou a substituição da utilização desses tecidos nervosos. Assim, atualmente, sua tecnologia foi substituída pelo uso principalmente de células VERO e outros sistemas de cultura como rins e pulmões de hamster, cérebro de cobaias, embrião de galinha ou neuroblastoma murino. A inativação viral é feita com beta propiolactona (BPL), etilenonimina binária, acetiletilamina ou luz ultravioleta (YANG et al., 2013).

As vacinas atenuadas contra a raiva utilizam o vírus vivo, que é enfraquecido através da passagem entre várias células. Essas vacinas, porém, pararam de ser recomendadas pela OMS em 2004, pelo seu risco de desenvolvimento de sinais clínicos da raiva nos animais e caíram em desuso (YANG et al., 2013).

As demais vacinas são mais atuais e ainda estão em estudo, buscando cada vez mais induzir uma resposta imune potente mantendo sua segurança, como as com vetor recombinante, que tornam o vírus da raiva não patogênico pela modificação do gene que expressa a

glicoproteína G viral. As vacinas de DNA consistem na utilização de DNA ou plasmídeo que codifica o gene da glicoproteína G do vírus (YANG et al., 2013).

A Portaria nº 228 de 1988 admite a fabricação de vacinas antirrábicas com vírus inativado e modificado. A dose recomendada é de 2 ml para herbívoros domésticos e 1 ml para cães e gatos via subcutânea ou intramuscular independente da idade, devendo-se realizar um reforço a cada ano (INSTITUTO PASTEUR, 1999).

Em relação às vacinas aviárias, utiliza-se principalmente vacinas vivas atenuadas, também enfraquecidas pela passagem entre células. Por serem feitas a partir do vírus vivo, estas têm grande capacidade protetora, geralmente necessitando de menos doses vacinais.

Devido a importância dessas doenças, as vacinas comercializadas devem ser fiscalizadas para que se comprove que são seguras e eficazes para os animais. Assim, o órgão competente que faz essa fiscalização de vacinas comercializadas no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Decreto 5.053 de 2004. Esse documento regulamenta a fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos fabricantes ou que façam a sua comercialização. O artigo 46 do capítulo X refere-se ao controle de qualidade, em que se destaca:

Os produtos de uso veterinário e as matérias primas empregadas na sua fabricação, deverão atender às normas de qualidade e segurança, obedecendo aos atos específicos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no que se refere à identidade, à atividade, à pureza, à inocuidade, à esterilidade, à contagem e à identificação de patógenos, à eficácia, à potência e à segurança, segundo a natureza do produto. (BRASIL, 2004).

Assim, os estabelecimentos fabricantes têm o dever de realizar esse controle de qualidade, que será colocado em prova pela análise de fiscalização da rede de laboratórios do MAPA, como está especificado no artigo 49 do capítulo XI referente à análise de fiscalização:

O serviço oficial efetuará a colheita de amostras de matérias-primas ou produtos acabados, em qualquer dos estabelecimentos mencionados no art. 1º, para fins de análise de fiscalização que será realizada pela rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2004).

Os produtos só poderão ser comercializados após a confirmação pelos laboratórios oficiais que estão adequados para utilização. Caso reprovem na análise de fiscalização, a empresa poderá solicitar uma contraprova, exceto nos casos em que o produto foi condenado nos testes de esterilidade ou inocuidade, ou pesquisa de agentes estranhos à sua formulação.

Nos casos de reprovação dos produtos, além de ser obrigatória que a empresa inutilize-os, a mesma poderá ainda ter que arcar com multas e outras penalidades em seu estabelecimento (BRASIL, 2004). No que se refere às vacinas, que são produtos biológicos, avalia-se a pureza, identidade, titulação, sorologia, esterilidade, inocuidade, eficácia e potência/imunogenicidade.

Em relação às vacinas antirrábicas, a Portaria Ministerial nº 228 de 25 de outubro de 1988 instrui sobre o controle da produção e comercialização das vacinas e do soro antirrábico para uso veterinário (BRASIL, 1988). Já em relação às vacinas aviárias, é a Instrução Normativa nº 07 de 20 de março de 2006 que instrui sobre a produção e controle de vacinas utilizadas na avicultura (BRASIL, 2006).

1.4 Objetivos do estágio e Divisão do tempo

O Estágio Supervisionado - PRG 107 - é uma disciplina obrigatória para a conclusão do curso de bacharel em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras. A carga horária da disciplina é de 476 horas, sendo dividida em 408 horas práticas e 68 horas teóricas, em que se destina a elaboração do relatório do estágio.

A parte prática da disciplina foi desenvolvida no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-SP), com o objetivo de colocar em prática todos os conhecimentos obtidos durante o curso. O período de estágio foi de 23 de março a 08 de julho de 2023, sob a supervisão do Médico Veterinário Henrique Paloschi Horta e a orientação da professora Maria Raquel Isnard Moulin do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

O presente trabalho é composto pela descrição do local de estágio, descrição das atividades desenvolvidas durante esse período e por um capítulo destinado à questão do bem-estar dos animais de laboratório.

2 ESTÁGIO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DE CAMPINAS

2.1 Descrição do local de estágio

O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-SP) localiza-se na Rua Raul Ferrari, s/n, Jardim Santa Marcelina, em Campinas, São Paulo. Funciona de segunda a sexta-feira, das 8 às 17 horas. O local consiste em um núcleo que colabora para a manutenção da sanidade agrícola e animal e também da saúde da população brasileira, por realizar atividades como diagnóstico de doenças animais, testes de vacinas animais, destinação e manejo correto de resíduos, entre outras.

O setor em que se desenvolveu o estágio foi na Unidade de Controle de Produtos Biológicos (CPB). Esse setor é dividido em dois prédios, o de Raiva e o de Aviárias. Ambos os locais realizam testes de vacinas disponíveis no mercado, sendo que o primeiro faz testes de vacinas antirrábicas inativadas e o segundo faz testes de vacinas atenuadas contra Doença de Gumboro, Bronquite Infecciosa das Aves e Doença de Newcastle. O nível de biossegurança dos prédios é 2 (NB-2).

No prédio da Raiva há dois técnicos de laboratório, um auxiliar técnico, um auxiliar de limpeza e um auditor fiscal federal veterinário, que é o responsável técnico. A entrada no prédio da Raiva é feita pelos vestiários, sendo exigido que se faça a troca de roupas para entrar. Nesse local há dois chuveiros disponíveis, sendo o banho para entrada opcional e o banho para saída obrigatório. Não é permitida a entrada de pessoas não vacinadas e com exame de titulação de anticorpos insuficiente contra a raiva no local. Para indivíduos não vacinados, como visitantes, é necessário que utilizem um capuz com filtro de ar. Também existe acesso ao prédio por um *airlock*, porém, nesse local só é feito o recebimento de amostras, documentos, entre outros, não sendo permitida a entrada de pessoas.

Há duas grandes áreas no prédio: uma sem acesso aos animais e uma com acesso aos animais, sendo elas divididas por *airlocks*. Na primeira área, tem-se duas áreas administrativas, com computadores e armários com documentos; uma área de armazenamento, que consiste na sala de geladeiras e freezers e recepção de amostras; e três áreas analíticas, com uma sala de esterilidade, uma sala de microscópio e estufas e uma sala de câmara fria e acesso ao laboratório. Na área com acesso aos animais, há um corredor com acesso a seis áreas analíticas, sendo elas: sala de quarentena, sala de vacinação NIH, sala de desafio NIH, sala de inativação viral e inocuidade de camundongos, sala de inocuidade de cobaias e sala de eutanásia. Há também três

áreas de apoio, sendo elas: sala de troca de água e autoclave, sala de lavagem de caixas, em que há acesso a uma saída de emergência e sala de lavagem e esterilização de materiais. Também há uma área de armazenamento, em que há o recebimento e armazenamento de ração e maravalha. Por fim, há um almoxarifado para armazenamento de insumos e uma copa para refeição dos funcionários.

Já o prédio da Aviárias possui dois vestiários com um chuveiro em cada, em que também o banho para entrada e o banho para saída são opcionais. Não há exigência de nenhuma vacinação para entrada no local e a troca de roupas só é necessária quando se acessa os laboratórios, podendo utilizar somente um propé ou fazer a troca de sapatos para frequentar a sala administrativa. Há um *airlock* com acesso à área externa em que são recebidas amostras e documentos.

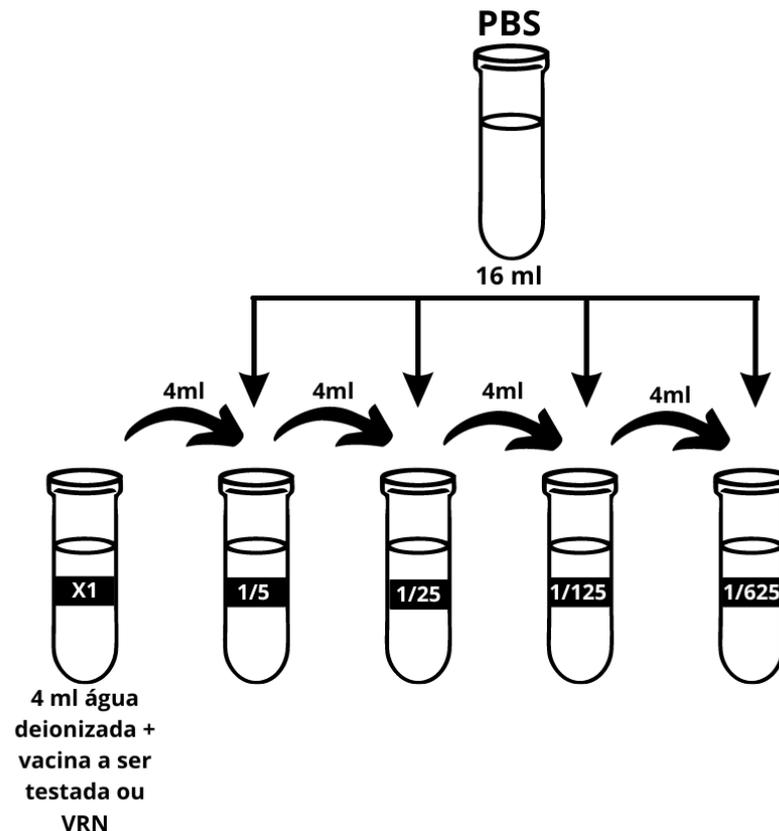
O prédio conta com uma sala em que são feitos os testes de esterilidade das vacinas, uma sala de lavagem e esterilização de materiais e uma sala laboratorial com cabines de segurança em que são feitas as diluições das vacinas. Há também uma sala com incubadoras, em que são incubados os ovos que estão sob testes vacinais, uma sala de necropsia, em que são necropsiados os ovos embrionados ao final do teste; duas salas com isoladores, local em que as aves permanecem durante o período do teste e uma copa para refeição dos funcionários. Nesse prédio há três técnicos de laboratório, um auxiliar técnico, um auxiliar de limpeza e um auditor fiscal federal veterinário, que é o responsável técnico.

2.2 Descrição das atividades desenvolvidas

2.2.1 Teste NIH

Foi possível acompanhar o teste NIH (*National Institutes of Health*), feito para medir a potência das vacinas antirrábicas inativadas. O teste consistia em vacinar grupos de 16 camundongos de 11-14g da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss albino, fornecidos pelo biotério próprio do LFDA-SP. Eram feitas duas vacinações com intervalo de 7 dias via intraperitoneal de 0,5ml, utilizando amostras diluídas de vacinas nacionais ou internacionais, além de uma vacina de referência nacional (VRN), que serve como parâmetro para comparações entre os resultados. As diluições eram feitas com PBS com pH 7,6, sendo usadas da seguinte forma: 1/5, 1/25, 1/125 e 1/625, como esquematizado na figura 1.

Figura 1 - Esquema de diluição das vacinas teste e VRN.

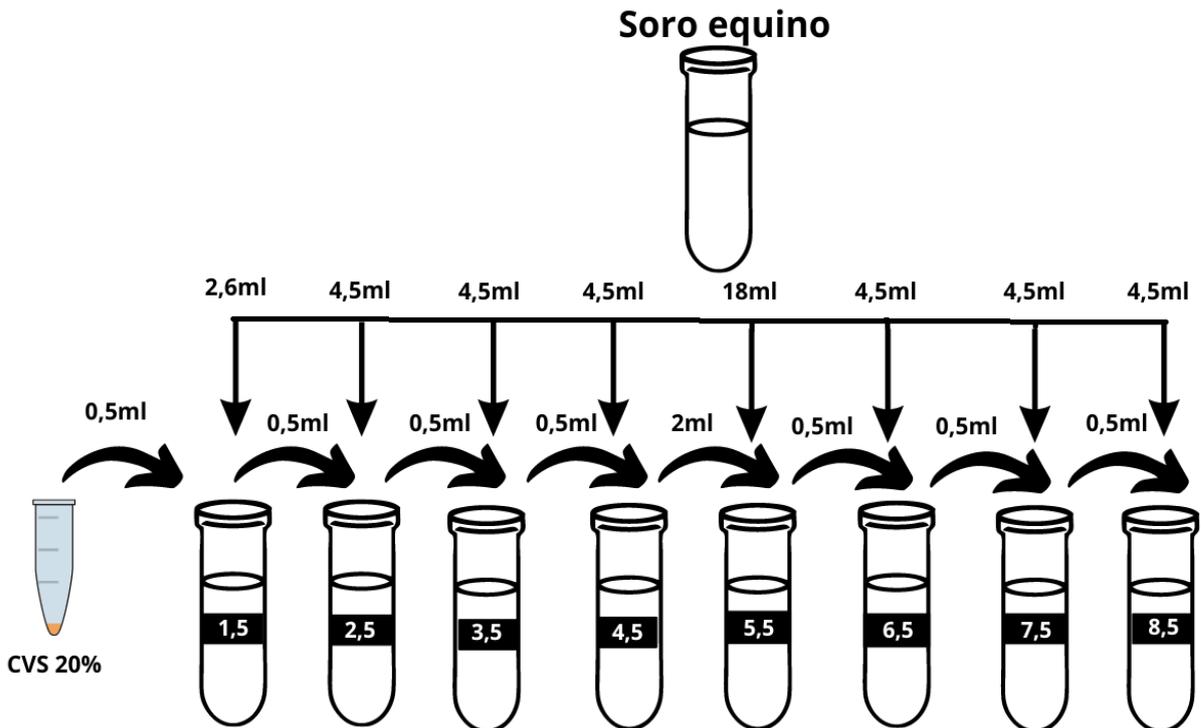


Fonte: Da autora (2023).

Para a reconstituição da VRN, que é liofilizada, utilizava-se água deionizada. Além dos animais vacinados, também se separava quatro grupos controle com 10 animais cada, em que não se realizava a vacinação. Esses camundongos eram usados para confirmar a patogenicidade do vírus e também para a realização do cálculo da titulação do vírus.

Após 14 dias da primeira vacinação, realizava-se o desafio dos animais, inoculando-se 0,03ml do vírus CVS (*Challege Virus Standard*) via intracerebral em todos os animais, dentre os vacinados e os controle, em diferentes diluições. Esse vírus de laboratório é considerado fixo, que tem forte afinidade neurotrópica mas não é secretado na saliva como o vírus isolado de morcegos. Na diluição utilizada para o desafio dos animais vacinados, ele só provoca a doença se for inoculado via intracerebral. A diluição viral era feita de maneira semelhante às diluições das vacinas, utilizando para isso um soro equino de animais não vacinados para a raiva. A figura 2 esquematiza essa diluição, sendo que a diluição usada para o desafio depende do título do vírus utilizado. Na figura, considerou-se que a diluição usada para o desafio foi a 5,5, que possui 32DL. Esta é a dose letal do vírus, ou seja, a dose que tem a capacidade de provocar a doença e conseqüentemente a morte dos animais.

Figura 2 - Esquema de diluição do vírus para o desafio.



Fonte: Da autora (2023).

Para o desafio, os camundongos eram previamente anestesiados com xilazina 2% e cetamina 10%, por ser considerado um procedimento invasivo. O protocolo anestésico era feito com a proporção de 1 ml de xilazina para 2 ml de cetamina e 27 ml de água estéril. Após o desafio, os animais eram observados por 14 dias, devendo ser preenchido um formulário com a seguinte legenda, ilustrado pela figura 3: I (sadios, sem alterações compatíveis com a raiva), S (suspeito, podendo evoluir ou não para a doença), D (doente, com sinais clínicos de raiva), Pa (paralítico, sem conseguir se alimentar ou beber água), Ps (prostrado, estado geral ruim) ou M (morto).

Figura 3 - Formulário de leitura do Teste NIH.

REGISTRO DA AMOSTRA: _____					TESTE Nº: ____/____/____				
VACINAÇÃO 1ª: ____/____/____					DESAFIO: ____/____/____				
VACINAÇÃO 2ª: ____/____/____					TÉRMINO: ____/____/____				

Dias	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
Data														
1/5														
1/25														
1/125														
1/625														
RTL														

CÁLCULO 1/5: 1/25: 1/125: 1/625:	I = Sadio S = Suspeito D = Doente Pa = Paralítico Ps = Prostrado (Sacrificado) M = Morto RTL = Responsável Técnico pela Leitura
---	---

RESPONSÁVEL TÉCNICO/DATA
CONFERIDO POR/DATA

Fonte: Da autora (2023).

De maneira geral, quando o animal já se apresentava paralítico ou em estado crítico, eles já eram retirados da caixa e eutanasiados, a fim de evitar sofrimento desnecessário. Os sinais clínicos da doença começavam a aparecer a partir do 5º dia após a inoculação viral, portanto, os animais que morriam antes eram retirados e não considerados no teste, não sendo admitido que tenham morrido de raiva. Ao final dos 14 dias, todos os animais sobreviventes eram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂.

Após esse período de teste, utilizava-se como base para os cálculos os animais que morreram ou que foram eutanasiados em relação ao total que foi inoculado. Os dados obtidos eram colocados no programa WHOPROG 2, em que se obtinha a potência da vacina e a DE 50 (Dose Efetiva 50%, é a dose efetiva que protege 50% dos animais).

A tabela 1, extraída do manual de procedimentos do MAPA de Fiscalização de Estabelecimentos e de Produtos de Uso Veterinário ilustra os testes realizados no laboratório e os resultados esperados para que a vacina seja aprovada.

Tabela 1: Testes necessários para as vacinas antirrábicas e resultados esperados para aprovação.

Vacinas antirrábicas - Portaria Ministerial n° 228 de 25 de outubro de 1988		
Vacinas inativadas		
Parâmetro	Resultado Esperado	Reprobatório (quando fora do esperado)
Esterilidade	Ausência de crescimento de fungos ou bactérias	SIM
Vírus residual	Camundongos saudáveis por 21 dias	SIM
Inocuidade	Animais saudáveis: cobaias 21 dias e camundongos 14 dias	SIM
Umidade (liofilizada)	O teor da umidade não deve ultrapassar 3%.	SIM
Tempo de reconstituição (liofilizada)	Não deve ultrapassar 60 segundos	SIM
Eficiência/Potência	≥1,0 UI (teste NIH) *	SIM
pH	6,8 a 8,5	SIM
Vácuo (liofilizada)	Presença	SIM

(*) Referência: Para avaliação da potência, é realizado atualmente apenas o teste NIH. De acordo com a Portaria 228, seria 0,3 UI. No entanto, a OMS preconiza 1,0 UI, o que vem sendo adotado pelo MAPA.

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021).

De maneira geral, uma vacina potente e adequada para comercialização seria aquela que possuía alta capacidade de proteção frente ao desafio, que era a inoculação intracerebral do vírus. A potência mínima para ser aprovada deveria ser de 1,0 UI.

2.2.2 Produção de vírus rábico

Também foi possível acompanhar a produção de vírus que é usado para o desafio e para o controle do teste NIH. Nesse procedimento, era utilizado uma cepa de vírus semente, fornecida por uma instituição de referência internacional. Calculava-se então a diluição

necessária da suspensão viral que continha 100 DL50% (Dose letal 50%, é a dose que mata 50% dos animais). Era feita a diluição com albumina ou soro equino dentro da cabine de segurança biológica.

A preparação da suspensão viral era então inoculada via intracerebral em camundongos de 11-14g, em grupos previamente separados, totalizando por volta de 100 animais. Estes não eram previamente submetidos à anestesia, por serem animais menores e haver maior risco anestésico. Os animais eram então observados até desenvolverem os sinais clínicos da raiva, sendo retirados para eutanásia quando chegavam ao estágio mais avançado da doença.

As carcaças eram então congeladas e somente eram descongeladas e lavadas no dia da produção viral. Nesse dia, dentro da cabine de segurança biológica, seus cérebros eram retirados, peneirados e se adicionava uma solução de água e sacarose com antibiótico e antifúngico para evitar o crescimento de microrganismos. A solução passava por mixer e centrífuga por 50 minutos a 1500 rpm e na temperatura de 4°C. Após isso, tem-se a solução de vírus trabalho, que é distribuída em frascos menores e eram elas as utilizadas para o desafio dos animais no teste NIH.

2.2.3 FAVN

Também foi possível acompanhar o início do estudo de um teste que estava sendo feito de forma paralela aos demais, sendo um método levantado como alternativa ao teste NIH, por ser menos invasivo. O teste utilizava a técnica FAVN (Teste de Vírus Neutralização com Anticorpo Fluorescente) e consistia na neutralização *in vitro* de uma quantidade de vírus padrão CVS, adaptado à cultura celular. O teste ainda não havia começado, devido a alta demanda de serviços no setor e pouco pessoal capacitado para isso. Assim, foi aberto um edital para seleção de um bolsista para dar andamento ao teste. Essa metodologia surgiu como proposta de alternativa para melhorar o bem-estar animal baseado na tríade reduzir, refinar e substituir os animais utilizados em pesquisa. Entretanto, o NIH ainda é o método aprovado pela legislação brasileira.

2.2.4 Teste de esterilidade

Também se acompanhou o teste de esterilidade, que visa a observar se há crescimento de microrganismos em um meio com as amostras de vacinas testadas. Para isso, dentro da cabine de segurança biológica, era inoculado um pool de uma amostra vacinal em quatro tipos

de tubos de meios de cultura: caldo Sabouraud, caldo Tioglicolato, caldo Casoy e ágar Sabouraud. Estes então eram colocados em estufas, sendo que os meios Sabouraud ficavam a 22°C e os demais a 35°C. Essa diferença de temperatura se deve ao tipo de crescimento de microrganismo que se objetivava, pois os fungos têm temperatura ótima de crescimento de 22°C enquanto as bactérias de 35°C. Os frascos eram então observados por 15 dias, e no último obtinha-se os resultados finais. Um meio turvo indicava o crescimento de microrganismos e isso gerava um reteste da amostra. Caso no próximo teste ela se apresentasse contaminada novamente, realizava-se o teste em placas com meios de cultura, que definiria se a amostra realmente seria reprovada ou não. Em alguns casos, o adjuvante vacinal era visto sedimentado no fundo do frasco, apresentando-se de cor mais escura, sendo isso uma ocorrência normal.

2.2.5 Teste de inocuidade de cobaias

No laboratório também é feito o teste de inocuidade de vacinas em cobaias, Preá (*Cavia porcellus*) e em camundongos, realizado para observar se os animais vacinados sofrem algum tipo de reação adversa ao imunizante. Para isso, as cobaias eram previamente pesadas e deveriam ter entre 350 e 450g. Sua pelagem era então pintada, sendo que cada cor correspondia a uma amostra vacinal. Os animais eram contidos, o local de vacinação passava por antissepsia e vacinava-se via subcutânea, na porção ventral do animal. As leituras eram feitas diariamente ou em dias alternados por 21 dias, observando se o local de aplicação apresentava alguma ferida. Além dos animais vacinados com as amostras, um grupo controle também era vacinado com amostras vacinais previamente aprovadas nesse teste (amostra padrão).

O teste em camundongos era feito de forma semelhante, em que os animais deveriam ter cerca de 14g, com a diferença de que não era feita a antissepsia previamente à vacinação. Ao final dos 21 dias, todos os animais eram eutanasiados em câmara de CO₂. Caso o resultado fosse insatisfatório, a amostra passava por reteste interno e, em caso de dois resultados insatisfatórios, o parecer final era de amostra reprovada.

2.2.6 Teste de vírus residual

Também se acompanhou o teste de vírus residual, feito para verificar se havia partículas virais viáveis nas amostras de vacinas antirrábicas inativadas. Para isso, animais neonatos lactentes eram vacinados via intracerebral e observados por 21 dias, sendo que para a amostra ser aprovada eles não deveriam apresentar sinais clínicos de raiva. As leituras eram feitas

diariamente ou em dias alternados. Ao final do teste todos os animais eram eutanasiados em câmara de CO₂. Caso a amostra obtivesse um resultado insatisfatório, era feito um reteste interno e, no caso de dois resultados insatisfatórios, era feita a prova de imunofluorescência para o diagnóstico de raiva e caso positivo a amostra era reprovada.

2.2.7 Titulação de vacinas aviárias

No setor de aviárias, foi possível acompanhar o teste de titulação das vacinas contra Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa das Galinhas e Doença de Gumboro. O objetivo do teste era avaliar se as amostras vacinais em questão eram capazes de gerar a doença em embriões de galinhas da espécie *Gallus gallus domesticus*, tendo em vista que se tratava de uma vacina viva atenuada. Dessa forma, uma vacina que causasse morte ou gerasse a doença nos embriões indicava que era uma vacina adequada, o contrário do que ocorria no teste NIH das vacinas antirrábicas.

As etapas desse teste eram as seguintes: era feita a inoculação de amostras das vacinas em diferentes diluições em ovos embrionados de 8-11 dias. Anteriormente à vacinação, esses ovos eram submetidos à ovoscopia para avaliar se estavam sadios e sua casca era então furada com o auxílio de uma agulha. Ao total eram inoculados 28 ovos, sendo 7 de cada diluição e também se utilizava 10 ovos para controle negativo, em que não se inoculava nada; e 5 ovos para controle positivo, em que se inoculava o vírus e não era feita a vacinação.

A inoculação com as vacinas contra Doença de Newcastle e Bronquite era feita na câmara de ar; e a inoculação com as vacinas contra Doença de Gumboro era feita no saco da gema. Os ovos eram então dispostos em incubadoras na temperatura de 37°C. Os ovos inoculados com as vacinas contra Doença de Gumboro e Bronquite eram então observados por ovoscopia durante 7 dias, e os inoculados com vacinas contra Doença de Newcastle por 6 dias.

Nas primeiras 24h após a inoculação, caso algum embrião tivesse morrido, ele era desconsiderado do teste e não se admitia que ele havia morrido pelas doenças analisadas. Ao longo dos dias de observação, caso algum embrião morresse, eram retirados ovos com embrião do controle negativo para eutanásia. Esta era feita através da retirada do ovo da incubadora e sua colocação na geladeira.

Ao final do teste, todos os embriões sobreviventes eram eutanasiados na geladeira e era feita sua necropsia. Esta consistia na quebra do ovo e posterior observação dos embriões a fim de analisar se havia alguma lesão compatível com uma das doenças. Embriões com lesões compatíveis com Bronquite manifestavam nanismo e enrolamento e os com lesões compatíveis

com Doença de Gumboro apresentavam lesões hepáticas. Essas características eram observadas comparando-se com os embriões do controle negativo. Além disso, para diagnosticar a Doença de Newcastle nesses embriões, era feito o teste de hemaglutinação do líquido corioalantoide após sua mistura com hemácias de galinhas. As amostras que apresentassem atividade hemaglutinante, ou seja, com a presença de grumos, eram consideradas positivas para a doença.

2.2.8 Teste de inocuidade em aves

Um outro teste que foi possível acompanhar foi o teste de inocuidade em aves, feito com a finalidade de observar se as vacinas tinham a capacidade de causar alguma reação ao organismo. Este era feito da seguinte maneira: vacinava-se grupos de 12 pintinhos no seu primeiro dia de vida com amostras vacinais contra as doenças supracitadas, conforme especificado pela empresa produtora. Algumas vacinações eram feitas via subcutânea, outras via ocular. Os animais eram previamente pesados. Após a vacinação, estes eram dispostos em isoladores e observados por 21 dias, avaliando se apresentavam alguma reação vacinal.

Após esse tempo, todos os animais eram eutanasiados. Para isso, isolava-se as aves em caixas e borrifava-se uma solução com desinfetante Virkon, deixando agir por três minutos. Os animais eram então anestesiados e fazia-se a quebra do pescoço usando um costótomo. O protocolo anestésico era feito com xilazina e cetamina, com a proporção de 2 ml de cetamina para 1 ml de xilazina, e a via de inoculação era pela musculatura do peito. Os animais só eram eutanasiados depois de se apresentarem totalmente anestesiados. Esses e outros testes envolvidos, exemplificados na tabela 2, estão previstos na legislação como obrigatórios para a aprovação das vacinas aviárias.

Tabela 2: Testes necessários para as vacinas aviárias e resultados esperados para aprovação.

Vacinas aviárias - Instrução Normativa nº 07, de 20 de março de 2006		
Parâmetro	Resultado Esperado	Reprobatório (quando fora do esperado)
Esterilidade	Parenteral: Estéril. Não Parenteral: Até 1 UFC não patogênica	SIM
Teste <i>Mycoplasma spp</i>	Ausência	SIM
Titulação	Tabela A (a seguir)	SIM
Inocuidade	Ausência de Reações Anormais em 10 aves vacinadas	SIM
Identidade	Para vírus ou bactérias demonstrada	
Deteção de Agentes Estranhos	Ausência de Vírus da Leucose Aviária, Reticuloendoteliose (REV) e Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV)	SIM
Sorologia	TABELA B (a seguir)	SIM
Potência	TABELA C (a seguir)	SIM
Umidade Residual (liofilizadas)	<5%	SIM
Vácuo ou gás Inerte	Presente	NÃO
pH	7 +-1 (ou de acordo com relatório técnico)	SIM
Volume	O indicado no rótulo	SIM

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021).

2.2.9 Visita ao biotério do LFDA-SP

Foi realizada uma visita ao biotério do LFDA-SP, responsável pelo fornecimento de animais para outros setores da instituição, como o CPB e o setor de Diagnóstico de Doenças Aviárias, além de envio para o LFDA-MG, de Pedro Leopoldo. O biotério consiste em um local de criação de camundongos (*Mus musculus*) e cobaias (*Cavia porcellus*) e manutenção de galos (*Gallus gallus domesticus*) e ovos embrionados de galinhas. Para entrar no local era exigido o banho e troca de roupas, além do uso de máscara facial de proteção e gorro.

Na visita, foi possível conhecer todos os setores. No setor de camundongos, acompanhou-se a rotina, em que se observou como é feita a troca de gaiolas dos animais, a desmama, o acasalamento e observação de partos. A sala possuía três divisões: uma em que se localizavam os animais que estavam se reproduzindo, outra em que ficavam os animais a serem enviados para os outros setores e uma com os animais de reposição. Todos eles permaneciam em gaiolas microisoladoras, com filtros de entrada e saída de ar, por serem considerados

animais SPF - Specific Pathogen Free ou Animais Livres de Germes Patogênicos Específicos. Essas gaiolas eram feitas de plástico e o piso era forrado com xilana e maravalha. Também era colocada uma toca para os animais se esconderem e abrigarem os filhotes e a água e ração eram fornecidas *ad libitum*.

No local destinado à reprodução dos animais, cada gaiola possuía um macho e uma fêmea, e caso houvesse, os filhotes. Após 21 dia de acasalamento, estes nasciam, anotava-se o dia do parto e mantinha-se 12 animais junto aos pais, caso nascesse mais do que isso eles eram retirados para eutanásia. Isso era feito porque um excesso de animais em uma mesma gaiola fazia com que a mãe não conseguisse amamentar todos os filhotes de forma adequada para o seu crescimento. O desmame dos filhotes era feito com cerca de 18 dias, quando eles iriam para a reposição dos próprios reprodutores; ou com 13 a 15 dias, quando seriam destinados aos laboratórios para os experimentos. Nesse desmame também se fazia a separação dos machos e fêmeas e destinava-se 15 animais em cada caixa a serem enviados aos laboratórios. A reprodução era feita utilizando o Método de Poiley, havendo cinco diferentes tipos de família: A, B, C, D e E. Esse método consiste em um acasalamento rotacional que objetiva manter os animais heterozigotos, evitando-se que parentes próximos acasalem entre si e consequentemente diminuindo os riscos dos problemas associados à consanguinidade.

Os animais eram trocados de gaiola uma vez por semana, e todos os procedimentos supracitados, como desmame e acasalamento eram feitos por profissional capacitado em cabine de contenção biológica.

Em relação ao setor de cobaias, havia duas salas destinadas a eles, em que os animais eram separados entre os reprodutores e os filhotes a serem destinados aos laboratórios de experimentação. Nas caixas de reprodutores ficavam três fêmeas e um macho em cada uma, e o acasalamento também seguia o Método de Poiley, com quatro tipos de famílias: A, B, C e D. Cada fêmea de uma caixa era marcada com um bastão de cor diferente e assim que os filhotes nasciam, eles também eram marcados conforme a cor da mãe, a fim de facilitar a supervisão dos animais. Os partos ocorriam a cada dois meses aproximadamente e o desmame era feito com 21 dias. Cada fêmea gerava em torno de dois a quatro filhotes por parto. A água e ração também eram fornecidas *ad libitum* e em quatro dias da semana eles eram suplementados com capim elefante que servia como fonte de vitamina C e também como enriquecimento ambiental. Além disso, em cada caixa também se colocava tubos de pvc cortados que serviam como tocas para esconderijo como forma de enriquecimento ambiental.

O setor de galos era inteiramente controlado por um sistema de ventilação em que não havia contaminação pelo ar externo, sendo que para entrar no local era necessário passar por

chuveiro de desinfecção. Esses animais ficavam em média dois anos no local, e deles era extraído sangue para fornecimento em laboratórios de testes diagnósticos, como o de hemaglutinação, feito para diagnosticar Doença de Newcastle. Os galos ficavam em gaiolas, dois em cada, e existiam alguns objetos dispostos para enriquecimento ambiental, como poleiro e fios de barbante pendurados.

3 BEM-ESTAR DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

3.1 Revisão de literatura

O bem-estar animal pode ser definido como a garantia de qualidade de vida para esses seres, tanto na sua saúde física quanto mental, além de proporcionar que possam exercer seu comportamento natural (BROOM; MOLENTO, 2004). Quando se refere aos animais de laboratório, as questões de garantia de bem-estar ainda são recentes no Brasil e trazem diferentes concepções a respeito.

Os animais utilizados na pesquisa científica tiveram grande contribuição para descobertas dos usos terapêuticos de fármacos, como os antibióticos; e técnicas, como a de transplante de órgãos. Além disso, a principal vantagem do seu uso é o de trazer informações do organismo como um todo (CHORILLI et al., 2007).

O uso de animais na pesquisa científica é descrito desde a Grécia Antiga, em que se realizava vivisseções a fim de observar as estruturas anatômicas e a partir disso tentar entender o funcionamento do corpo humano. Cláudio Galeno, em 129-210 d.C. foi pioneiro na realização de cirurgias em animais também na tentativa de observar as similaridades com o organismo humano. Durante muitos anos os animais foram sendo usados com esses fins sem nenhuma preocupação com seu bem-estar, mas a partir de 1860, iniciou-se a imposição de alguns limites, através das publicações de Claude Bernard sobre o sofrimento dos animais de laboratório (FURTADO, 2020).

Um grande marco na experimentação animal ocorreu com a publicação do livro de Russel e Burch, em que se estabeleceu o “Princípio Ético dos três Rs: Replace, Reduce e Refine”. “Replace” se refere à substituição dos modelos de animais na experimentação, utilizando outros métodos como culturas de células ou tecidos, modelos computacionais, uso de organismos mais simples, como procaríotos e fungos, e chips que simulam os organismos. Quando essa substituição não é possível, parte-se para o “reduce”, que é a redução da quantidade de animais utilizados. Por fim, há o “refine”, que se refere ao refinamento, quando a substituição não é possível e já foram tomadas medidas para reduzir o número de animais. O refinamento consiste na diminuição da realização de procedimentos desumanos ou a utilização de métodos que minimizem a dor e angústia, como modificações no manejo, enriquecimento ambiental e uso de analgésicos e anestésicos (DÍAZ et al., 2021).

No Brasil, a Lei Arouca nº 11.794 de 2008 foi o principal marco para a adequação do uso de animais em pesquisa. A partir dela estruturou-se o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), foi criado o Cadastro das Instituições de Uso Científico

de Animais (CIUCA) e normatizou-se as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) (BRASIL, 2008). Com isso, algumas resoluções normativas foram criadas, como a 32, 49, 50, 51, 53 e 55. Esta última discorre sobre o cuidado e a utilização de animais na pesquisa, abordando as responsabilidades dos envolvidos, os três “Rs” e o manejo adequado dos animais.

Apesar desses avanços, muitos testes ainda são realizados em animais, como os testes vacinais. O método NIH, usado para determinar a potência de vacinas antirrábicas, é um teste desenvolvido em 1953 e que utiliza um grande número de animais, além de causar dor e sofrimento a eles. Por essas e dentre outras desvantagens, alguns métodos alternativos já vêm sendo testados, como os de ensaios sorológicos (KRAMER et al., 2013).

Além disso, no Brasil, um importante avanço em relação à diminuição do uso de animais em pesquisa foi a criação da Portaria nº 560 de 2022, que permite a dispensa da realização dos testes de inocuidade em animais após comprovado o resultado satisfatório em dez partidas consecutivas dos produtos veterinários fabricados pelas empresas (BRASIL, 2022).

Dentre os animais utilizados na experimentação, o mais largamente empregado é o camundongo. Esse animal é pertencente à classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus* e espécie *Mus musculus*. Dentre as razões para seu uso destacam-se o seu pequeno tamanho, sua alta prolificidade, seu curto período gestacional e a facilidade do seu manejo (CHORILLI et al., 2007).

Em relação ao abrigo desses animais, suas gaiolas devem ser feitas de material autoclavável, como policarbonato ou polipropileno. Estas devem ser forradas para promover mais conforto aos animais, sendo a maravalha de pinus mais adequada para isso (PASSOS et al., 2006). O tamanho recomendado varia de 38,7 cm² a 77,4 cm², dependendo do peso dos animais, por 12,7 cm de altura (MOLINARO et al., 2009).

Os machos adultos são extremamente territorialistas, o que pode levar a brigas e grave comprometimento de seu bem-estar. Dessa forma, é importante que a formação de novos grupos de animais seja feita logo após o desmame, pois isso minimiza a ocorrência dessas brigas (FURTADO, 2020).

Já as cobaias, conhecidas popularmente como “porquinhos da Índia”, também são muito utilizadas em experimentos nos laboratórios. Esses animais são pertencentes à classe Mammalia, ordem Rodentia, família Caviidae, gênero *Cavia* e espécie *Cavia porcellus*. Em comparação aos camundongos, são mais suscetíveis a estímulos estressantes, assustando-se facilmente e apresentando um comportamento de correr de um lado para o outro. Também vocalizam em situações de prazer, como antes do fornecimento da alimentação (MOLINARO et al., 2009). O abrigo é semelhante ao de camundongos, com a diferença de ser maior, com

cerca de 387 cm² por 17,8 cm de altura para animais com menos de 350g (MOLINARO et al., 2009).

Em relação à alimentação de ambas as espécies, utiliza-se geralmente rações peletizadas e água fornecida por um sistema automático com válvulas (ANDRADE, 2006). As cobaias não sintetizam vitamina C, portanto, deve haver suplementação na dieta (MOLINARO et al., 2009).

A contenção dos animais deve ser feita de forma relaxada e firme, a fim de evitar estresse desnecessário e comprometimento do bem-estar (FURTADO, 2020).

A legislação brasileira prevê que o enriquecimento ambiental para roedores e lagomorfos mantidos em laboratórios é obrigatório (BRASIL, 2022). Estudos demonstram que animais que vivem em ambientes enriquecidos têm menor sensibilidade a estímulos estressantes (GARBIN; FALEIROS; LAGO, 2012). Os tipos de enriquecimento mais utilizados são o social, sensorial e físico. O social se caracteriza principalmente pela formação de grupos; o sensorial, pela introdução de objetos tais como brinquedos e elementos estruturais que sejam uma distração para os animais; e o físico pelo aumento do espaço das gaiolas (MIESKE et al., 2022).

Em relação à eutanásia de roedores, os métodos recomendáveis pelo CONCEA são principalmente o uso de anestésicos gerais ou sobredose de anestésicos dissociativos (Cetamina + Xilazina), podendo ser associados ao cloreto de potássio (BRASIL, 2018). Entretanto, um dos métodos mais utilizados são as câmaras de CO₂. Esse gás leva à morte por depressão do sistema nervoso central e hipóxia, sendo recomendado em uma concentração de até 40%. Apesar de ser de fácil obtenção e baixo custo, existem algumas controvérsias em seu uso em relação ao sofrimento dos animais, sendo seu uso considerado aceito com restrição pelo CONCEA e feito quando não há outros métodos mais seguros (CFMV, 2013; BRASIL, 2018).

A recomendação do CONCEA de eutanásia de aves também é de ser feita com anestésicos gerais intravenosos ou inalatórios, podendo haver associação com cloreto de potássio (BRASIL, 2018).

Outro método também feito em laboratórios, utilizado em roedores de até 200g e aves pequenas, é o deslocamento cervical, sendo que deve ser feito sempre que possível a anestesia geral prévia dos animais. Os executores devem ser bem treinados para que a morte ocorra rapidamente e sem sofrimento (CFMV, 2013). Essa também é uma técnica aceita com restrição pelo CONCEA (BRASIL, 2018).

Já a eutanásia de ovos embrionados de galinhas é recomendada que seja feita através de resfriamento por submersão de 20 minutos e consequente maceração ou decapitação. Em ovos com mais de 15 dias também podem ser utilizadas câmaras de CO₂ e overdose de anestésicos (CFMV, 2013).

3.2 Bem-estar de roedores nos laboratórios de experimentação animal

Durante o período de estágio, foi possível acompanhar a rotina de cuidados com os animais. Os camundongos permaneciam em caixas de 44 cm x 28 cm e 15 cm de altura forradas com maravalha e possuíam água e alimentação com ração à base de milho *ad libitum*, conforme ilustrado nas figuras 4 e 5.

Figura 4 - Caixa dos camundongos, vista lateral.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 5 - Caixa dos camundongos, vista de cima.



Fonte: Da autora (2023).

Ao chegar, os animais ficavam em uma sala de quarentena e eram pesados e separados para a realização dos testes. No teste NIH, eram usados 10 animais por caixa para cada diluição do vírus e 16 animais por caixa para cada diluição da amostra vacinal. Foi observado que por haver a formação de novos grupos de animais ainda recém desmamados, ocorriam poucas brigas entre os machos, o que impacta positivamente no seu bem-estar. Quando essas brigas ocorriam, o animal machucado era separado do grupo e dependendo do seu estado geral era retirado para eutanásia.

Alguns tipos de enriquecimento ambiental eram utilizados, tais como o social, alimentar e sensorial. A formação de grupos dos animais era um tipo de enriquecimento social, visto que essa espécie tem hábito de convivência em grupo, tendo comportamento de dormir juntos e limpar uns aos outros. Em relação ao enriquecimento alimentar, as rações ficavam dispostas no alto da caixa, o que fazia com que eles tivessem que se esticar ou pular na grade para se alimentarem, dificultando seu acesso e assim eles permaneciam mais entretidos. No aspecto sensorial, eram colocados alguns brinquedos como rolo de papel higiênico e pedaços de embalagens usadas para autoclavar materiais. Dessa forma, eles poderiam se esconder e também roer os papéis, representando uma distração para os camundongos, como representado na figura 6. Além disso, em caixas com a mãe e seus filhotes, eram colocadas tocas de plástico, a fim de promover o comportamento de nidificação, típico de roedores, como mostrado na figura 7.

Figura 6 - Rolo de papel higiênico utilizado como enriquecimento ambiental.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 7 - Toca de plástico utilizada como enriquecimento ambiental.



Fonte: Da autora (2023).

Um bom indicador de bem-estar desses animais era o ganho de peso durante todo o período que permaneciam no laboratório. O teste de NIH, no entanto, inevitavelmente causava sofrimento nos animais, visto que alguns ficavam doentes e a raiva deixava-os debilitados. Apesar disso, logo que se constatava que a doença já estava em estágio avançado, os animais eram retirados para eutanásia, para evitar sofrimento desnecessário.

Além disso, para a produção do vírus rábico utilizado nesse teste, fazia-se a inoculação intracerebral nos animais sem anestesia, representando um procedimento invasivo. Não se utilizava anestésicos devido ao alto risco, por serem animais menores. Além disso, nessa produção era preciso que os camundongos ficassem extremamente prostrados com a doença para retirá-los para a eutanásia, o que impacta no seu bem-estar.

Por esses e outros motivos, como a variabilidade e o alto custo do teste NIH, o método FAVN estava em início de teste. Essa metodologia pretendia seguir com os conceitos propostos por Russell e Burch, de refinamento e redução dos animais de experimentação. A implementação de um novo método, no entanto, tem entrave em relação à legislação, visto que no Brasil o método referência para o teste de potência das vacinas antirrábicas é o NIH.

Em relação ao manejo das cobaias, estas eram dispostas em grupos de 10 animais em cada caixa, de 88 cm x 32 cm x 28 cm de altura, também forradas com maravalha, conforme ilustra a figura 8.

Figura 8 - Caixa das cobaias, vista lateral.



Fonte: Da autora (2023).

Um tipo de enriquecimento ambiental utilizado com esses animais era o de fornecimento de capim elefante, que, além de ser uma fonte de suplementação de vitamina C, é um alimento extremamente apreciado por essa espécie. No momento do fornecimento os animais apresentavam uma vocalização característica.

A luminosidade do ambiente, tanto dos camundongos quanto das cobaias, era controlada por um timer que controlava 12h de luz apagada, das 18h às 6h, e 12h de luz acesa, das 6h às 18h. A temperatura do ambiente também era monitorada duas vezes ao dia, devendo estar entre 21 a 25°C.

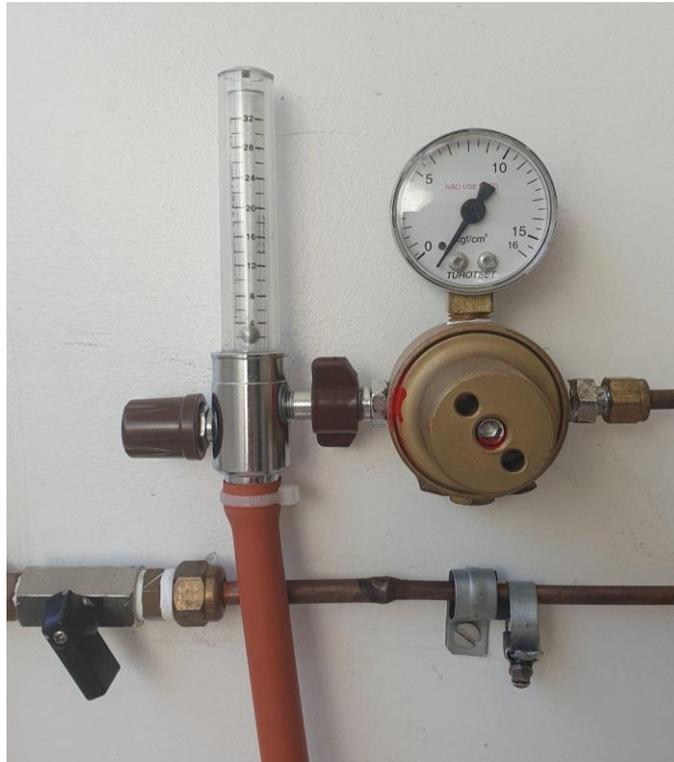
Em relação à eutanásia dos animais, utilizava-se para os roedores a câmara de CO₂, ilustrada na figura 9. A concentração de gás utilizada era de no máximo 40% e esta era controlada por um fluxômetro, ilustrado na figura 10.

Figura 9 - Câmara de CO₂ usada para eutanásia dos roedores.



Fonte: Da autora (2023).

Figura 10 - Fluxômetro da câmara de CO₂.



Fonte: Da autora (2023).

Essa técnica de eutanásia, apesar de não ser recomendada pelo CONCEA, é aceita com restrição e tem vantagens como o menor custo e a eutanásia de um grande número de animais ao mesmo tempo, por isso é a mais utilizada nos laboratórios.

A observação dos roedores durante o período de estágio permite a conclusão que o bem-estar desses animais é atendido em diversos aspectos, tais como a permanência do convívio social, o tamanho adequado das caixas em que eram mantidos e o enriquecimento ambiental utilizado, que os estimulava a expressarem seu comportamento natural. Além disso, a proposta de refinamento também era aplicada, tendo em vista que em procedimentos mais invasivos e estressantes como a inoculação intracerebral, utilizava-se anestesia dissociativa para minimizar esse impacto. É importante enfatizar, no entanto, que não há plena garantia do bem-estar de roedores durante todo o período de permanência em testes. Os animais prostrados com raiva e a eutanásia realizada na câmara de CO₂ são exemplos de causa de estresse. A melhoria nesses aspectos, como a utilização de outros métodos mais humanitários para eutanásia, esbarra em questões financeiras, por se tratar de um órgão governamental, e também na baixa quantidade de servidores para realizar os procedimentos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES

O estágio supervisionado realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária foi de extrema importância para a formação profissional em Medicina Veterinária. Ofereceu uma vivência em uma área direta de atuação em Saúde Única, por lidar com zoonoses e doenças que impactam a cadeia econômica nacional. Foi possível perceber a importância da Defesa Agropecuária tanto na proteção humana quanto animal, através da disponibilização no mercado de vacinas seguras e eficazes. Além da consolidação de conhecimentos obtidos durante a graduação, a convivência e o diálogo com a equipe foram de grande valia para o crescimento profissional e pessoal.

Também se elucidou o papel dos animais de laboratório no desenvolvimento científico e a importância de se ter uma conduta ética e prezar pelo seu bem-estar. Apesar desses animais ainda serem necessários em muitos testes utilizados, é importante que sejam aprovados e regulamentados na legislação brasileira novos métodos que sigam a proposta de redução, refinamento e substituição, propostas por Russel e Burch.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (Brasil). **Relatório Anual 2023**. São Paulo: [s. n.], 2023. 146 p. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2023.

BRASIL. **Decreto nº5.053, de 22 de abril de 2004**. Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. Casa Civil, Brasília, DF, 22 abr. 2004. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d5053.htm. Acesso em: 12 jun. 2023.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 07 de 10 de março de 2006**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 20 mar. 2006. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-mapa-no-7-de-10-03-2006.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Casa Civil, Brasília, DF, 8 out. 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2011.794%2C%20DE%208%20DE%20OUTUBRO%20DE%202008.&text=Regulamenta%20o%20inciso%20VII%20do,1979%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%AAsncias. Acesso em: 10 maio 2023.

BRASIL. **Portaria nº 228, de 25 de outubro de 1988**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 25 out. 1988. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/portaria/portaria-mapa-no-228-de-25-10-1988.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.

BRASIL. **Portaria nº 560, de 7 de abril de 2022**. Possibilita a dispensa da realização de testes de inocuidade com o uso de animais no controle de qualidade de produto de uso veterinário de natureza biológica. Diário Oficial da União: seção 1, ed. 68, p. 30, 8 maio 2002. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sda-n-560-de-7-de-abril-de-2022-391916812>. Acesso em: 12 maio 2023.

BRASIL. **Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018**. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 15 fev. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf>. Acesso em 30 maio 2023.

BRASIL. **Resolução nº 57, de 6 de dezembro de 2022**. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União: seção 1, ed. 229, p. 37, 7 dez. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-57-de-6-de-dezembro-de-2022-448572294>. Acesso em: 1 jun. 2023.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceitos e questões relacionadas – Revisão. **Arch. Vet. Sci.**, v.9, p.1-11, 2004.

CFMV (Brasil). **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: ASCOM/CFMV, 2013. 62 p. v. 1. Disponível em: <https://www.invitare.com.br/arq/ceua/Arquivo-5-Guia-de-Boas-Pr-ticas-para-Eutanasia.pdf.pdf>. Acesso em: 29 maio 2023.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 28, ed. 1, p. 11-23, 2007. Disponível em: https://ceuaics.ufba.br/sites/ceuaics.ufba.br/files/animais_de_laboratorio_o_camundongo_0.pdf. Acesso em: 16 maio 2023.

FURTADO, Ana Karina dos Santos. **A IMPORTÂNCIA DO BEM-ESTAR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO E SUA INFLUÊNCIA NOS RESULTADOS DE ENSAIOS CIENTÍFICOS**. Orientador: Gabriel Melo de Oliveira. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência em Animais de Laboratório) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/55359/ana_furtado_ictb_mest_2020.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Acesso em: 16 maio 2023.

DÍAZ, Lorenza *et al.* Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. **Revista de Investigación Clínica**, [s. l.], v. 73, ed. 4, p. 199-209, 2021. DOI 10.24875/RIC.20000380. Disponível em: <https://www.scielo.org.mx/pdf/ric/v73n4/0034-8376-ric-73-4-199.pdf>. Acesso em: 10 maio 2023.

GARBIN, Livia Camargo; FALEIROS, Rafael Resende; LAGO, Luiz Alberto do. Enriquecimento ambiental em roedores utilizados para a experimentação animal: revisão de literatura. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 10, ed. 2, p. 153-161, 2012. DOI 10.7213/academica.7692. Disponível em: https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/4453454/mod_resource/content/3/Revis%C3%A3o_enriquecimento_ambiental_2012.pdf. Acesso em: 30 maio 2023.

GOVERNO FEDERAL (Brasil). GOV.BR. Serviços e Informações do Brasil. *In*: GOVERNO FEDERAL (Brasil). GOV.BR. **Brasil lidera ranking mundial de exportação de carne de frango**. [S. l.], 2 set. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/financas-impostos-e-gestao-publica/2022/09/brasil-lidera-ranking-mundial-de-exportacao-de-carne-de-frango>. Acesso em: 12 jun. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). **Pesquisa Nacional de Saúde**. [S. l.]: IBGE, 2013. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/4930>. Acesso em: 16 maio 2023.

INSTITUTO PASTEUR (Brasil). **Vacinação contra a raiva de cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: [s. n.], 1999. 32 p. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_pasteur03.pdf. Acesso em: 6 abr. 2023.

ITO, Fumio Honma. Raiva Urbana: Aspectos clínicos e programas de controle. *In*: XXXV SEMANA CAPIXABA DO MÉDICO VETERINÁRIO E III ENCONTRO REGIONAL DE

SAÚDE PÚBLICA EM MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 3, 2008, Guarapari. **Anais [...]**, 2008. p. 1-11.

KRAMER, Beate *et al.* A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. **Biologicals**, [s. l.], v. 41, p. 400-406, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.08.003>. Acesso em: 10 maio 2023.

MARTINS, Nelson Rodrigo da Silva; ECCO, Roselene. Doença de Newcastle. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, ed. 76, p. 33-48, 2015. Disponível em: <https://www.vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2076%20sanidade%20avicola.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2023.

MARTINS, Nelson Rodrigo da Silva *et al.* Bronquite Infecciosa das Galinhas. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, ed. 76, p. 49-56, 2015. Disponível em: <https://www.vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2076%20sanidade%20avicola.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2023.

MARTINS, Nelson Rodrigo da Silva *et al.* Doença Infecciosa Bursal. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, ed. 76, p. 71-78, 2015. Disponível em: <https://www.vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2076%20sanidade%20avicola.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2023.

MIESKE, Paul *et al.* Bored at home?—A systematic review on the effect of environmental enrichment on the welfare of laboratory rats and mice. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 9, p. 1-19, 18 ago. 2022. DOI 10.3389/fvets.2022.899219. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.899219/full>. Acesso em: 30 maio 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). Colheita de amostras. *In*: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). **Manual de Procedimentos: Fiscalização de Estabelecimentos e de Produtos de Uso Veterinário**. Brasília: MAPA/SDA, 2021. cap. 8, p. 49-61. ISBN 978-65-86803-44-0

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Raiva Animal**. [S. l.], 4 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/r/raiva/raiva-animal>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MOLINARO, Etelcia Moraes *et al.* Animais de laboratório. *In*: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009. v. 1, cap. 4, p. 155-222. ISBN 978-85-98768-41-0. Disponível em: <https://www.epsjv.fiocruz.br/sites/default/files/1140.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2023.

OIE (Office International de Epizooties). Newcastle Disease. Terrestrial Manual capítulo 2.3.14. 2012. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf. Acesso em: 6 abr. 2023.

OLIVEIRA JUNIOR, Jorge Granja de *et al.* Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 381- 383, 2003.

OMS (Suíça). WHO Expert Consultation on Rabies. *In*: OMS (Suíça). **WHO Technical Report Series**. 982. ed. Suíça: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2013. cap. The burden of rabies, p. 2-7. ISBN 978 92 4 069094 3. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85346/9789240690943_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 1 abr. 2023.

SINGH, Rajendra *et al.* Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 37, ed. 1, p. 212-251, 23 jun. 2017. DOI 10.1080/01652176.2017.1343516. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2017.1343516>. Acesso em: 1 abr. 2023.

TAKAYAMA, Naohide. Rabies: a preventable but incurable disease. **Journal of Infection and Chemotherapy**, [s. l.], v. 14, p. 8-14, 2008. DOI 10.1007/s10156-007-0573-0. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088408/pdf/main.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2023.

VARGAS, Alexander; ROMANO, Alessandro Pecego Martins; MERCHÁN-HAMANN, Edgar. Raiva humana no Brasil: estudo descritivo, 2000-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 28, ed. 2, 2019. DOI 10.5123/S1679-49742019000200001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ress/a/CCzwqvYVXYPqhB9XfzMByK/?format=pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.

WANDELER, A. I.; BINGHAM, J.; MESLIN, F. X. Dogs and Rabies. *In*: MACPHERSON, C. N. L.; MESLIN, F. X.; WANDELER, A. I. (ed.). **Dogs, Zoonoses and Public Health**. 2. ed. Londres: CABI, 2013. cap. 4, p. 43-66. ISBN 978-1-84593-835-2.

YANG, Dong-Kun *et al.* The present and future of rabies vaccine in animals. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, [s. l.], v. 2, ed. 1, p. 19-25, 2013. DOI 10.7774/cevr.2013.2.1.19. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623496/pdf/cevr-2-19.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2023.