

NAPIER JOÃO RESENDE FILHO

**LEVANTAMENTO DE BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO TESTE DE
ANEL DO LEITE (TAL) EM PROPRIEDADES DOS MUNICÍPIOS MINEIROS
DE UNAÍ E BURITIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação do Mestrado
Profissional em Zootecnia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R4331 Resende Filho, Napier João, 1979-
2014 Levantamento de Brucelose Bovina utilizando Teste de Anel do
Leite (TAL) em propriedades dos municípios mineiros de Unaí e Buritis
/ Napier João Resende Filho. - Viçosa, MG, 2014.
vii, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador : Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.32-35..

I. Bovino - Doença. 2. Brucelose. 3. Teste de Anel do Leite.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20896

NAPIER JOÃO RESENDE FILHO

**LEVANTAMENTO DE BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO TESTE DE
ANEL DO LEITE (TAL) EM PROPRIEDADES DOS MUNICÍPIOS MINEIROS
DE UNAÍ E BURITIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação do Mestrado
Profissional em Zootecnia, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2014.



Prof. José Carlos Pereira



Prof.^a Maria Aparecida S. Moreira



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

A todos que acreditaram na minha dedicação profissional, em especial a DEUS, aos meus pais, às minhas irmãs e à minha esposa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específico	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Brucelose	4
3.2 Etiologia	5
3.3 Epidemiologia.....	6
3.4 Transmissão	8
3.5 Patogenia	9
3.6. Diagnóstico.....	11
3.6.1 Diagnóstico bacteriológico (direto).....	12
3.6.2 Diagnóstico sorológico (indireto).....	13
3.6.2.1 Antígeno acidificado tamponado (AAT).....	14
3.6.2.2 Teste do anel em leite (TAL).....	14
3.6.2.3 Teste de soraglutinação em tubos (SAT).....	16
3.6.2.4 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)	16
3.6.2.5 Teste de fixação de complemento (CFT)	17
3.7 Controle e profilaxia	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO 1	36

RESUMO

FILHO, Napier João Resende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2014.
Levantamento de Brucelose Bovina utilizando Teste de Anel do Leite (TAL) em propriedades dos municípios mineiros de Unaí e Buritis. Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

O objetivo neste trabalho foi verificar a ocorrência de brucelose bovina em vacas leiteiras nos municípios de Unaí e Buritis utilizando-se teste do anel do leite (TAL). Foram analisadas 423 amostras de leite coletadas no período de 5 de fevereiro a 3 de abril de 2014, na plataforma de recepção do laticínio e nas comunidades produtoras de leite. Dessas 423 amostras, 87 foram oriundas do município de Buritis e 336, de Unaí. Das amostras obtidas em Unaí, 200 foram coletadas na plataforma de leite de diferentes regiões do município; 92, da comunidade do Pico; e 44, na Associação do Funil. O TAL foi realizado estratificando-se as amostras positivas em cruzes. Do total de amostras analisadas, 73 apresentaram resultados positivos, correspondendo a 17,25% do total. Nas amostras dos municípios de Buritis e Unaí, 18,30% e 16,96% dos resultados foram positivos, respectivamente. No município de Unaí, a Associação do Funil foi a comunidade com maior ocorrência da doença, 38,64%, enquanto na comunidade do Pico a incidência foi de 16,30% e nas outras regiões do município, 12,5% dos resultados foram positivos. As amostras da Associação do Funil, com 38,64% de resultados positivos, são oriundas de pequenas propriedades, produtoras de até 300 L de leite e que armazenam o produto em latões. É provável, portanto, que o baixo volume de leite, a

acidificação, a presença de leite com mamite, e até com colostro, tenham contribuído para o aumento de resultados falso-positivos nessa associação. O programa nacional de prevenção à brucelose deve ser intensificado nas associações de pequenos produtores de leite e nas propriedades com resultado positivo com três cruces, uma vez que o programa reduz com maior segurança a ocorrência de resultados falsos-positivos, no entanto, deve-se realizar o teste AAT como confirmatório.

ABSTRACT

FILHO, Napier João Resende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2014. **Mapping Bovine Brucellosis with the Milk Ring Test (MRT) in farms in the municipalities of Unaí and Buritis, in the state of Minas Gerais, Brazil.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

The aim of this work was to verify the occurrence of bovine brucellosis in dairy cows in the municipalities of Unaí and Buritis using the milk ring test (TAL). 423 milk samples collected were analyzed for the period from February 5 to April 3, 2014, at the dairy receiving platform and in the milk producing communities. Of these 423 samples, 87 were derived from the municipality of Buritis and 336 from Unaí. Of the samples derived in Unaí, 200 were collected in the milk platform of different regions of the municipality; 92 of the community of Pico; and 44 in Associação do Funil. TAL was performed stratifying positive samples in crosses. Of total samples analyzed, 73 showed positive results, corresponding to 17.25% of total. In the samples of the municipalities of Buritis and Unaí, 18.30% and 16.96% of the results were positive, respectively. In the municipality of Unaí, Associação do Funil was the community with the highest occurrence of the disease, 38.64%, while in the community of Pico the incidence was of 16.30% and in the other regions of the municipality, 12.5% of the results were positive. The samples of Associação do Funil, with 38.64% of positive results, are from small farms producing up to 300 L of milk and storing the product in cans. It is likely, therefore, that the low volume of milk, acidification, the presence of milk with mastitis,

and even with colostrum, have contributed to an increase in false-positive results in this Associação. The national program for prevention of brucellosis should be intensified in the associations of small milk producers and properties with a positive result with three crosses, since the program more safely reduces the occurrence of false-positive results; however, the AAT test should be performed as confirmatory.

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose responsável por perdas econômicas nas criações de animais e que compromete especialmente o sistema reprodutivo, determinando queda na produção de leite. A transmissão do agente etiológico em bovinos ocorre principalmente pelo contato dos animais com ambiente contaminado com restos placentários provenientes de um animal infectado. Segundo Paulin & Ferreira (2003), no homem, uma das vias de transmissão é o leite contaminado e a principal porta de entrada é a mucosa do trato digestivo. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) classifica a brucelose como doença de notificação compulsória, categoria em que estão incluídas as enfermidades de grande importância socioeconômica e, ou para saúde pública e que têm consequências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2006).

Nos bovinos e bubalinos, a brucelose acomete especialmente o trato reprodutivo, gerando perdas diretas, ocasionadas principalmente por abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo de partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. Nas propriedades onde a doença está presente, o valor comercial de seus animais é menor. As regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados (BRASIL, 2005). Em razão do impacto econômico na saúde animal e do risco de contaminação da população humana, diversos países têm aplicado recursos para diagnóstico, controle e erradicação da brucelose. O regulamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) preconiza a

vacinação das fêmeas de 3 a 8 meses de idade e o diagnóstico sorológico dos animais por meio das provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e do teste do anel em leite (TAL) para o monitoramento de estabelecimentos certificados como livres de brucelose. A aplicação dos testes diagnósticos em rebanhos e laticínios fornece o diagnóstico da situação e permite que sejam adotadas medidas de controle eficazes.

De acordo com Silva Júnior et al. (2007), o TAL é uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica da brucelose bovina, indicada como método de diagnóstico presuntivo. No entanto, quando aplicado individualmente, por animal, e, ou em propriedades infectadas por brucelose, seus resultados são variáveis e dependem de alguns fatores, como período de eliminação e quantidade de anticorpos presentes no leite de animais infectados, tamanho da propriedade e frequência com que se realiza o controle do rebanho.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Realizar o levantamento das ocorrências de brucelose bovina no rebanho leiteiro de produtores que fornecem leite para a Cooperativa Agropecuária de Leite de Unaí e para o Laticínio de Buritis, Minas Gerais, por meio do teste do anel em leite (TAL).

2.2 Específico

- Realizar o levantamento da brucelose bovina no rebanho leiteiro das comunidades do Pico e do Funil, regiões pertencentes ao município de Unaí.
- Correlacionar os resultados positivos das amostras com o volume de leite produzido pelas propriedades.
- Identificar o intervalo de produção de leite e a forma de armazenamento de leite (tanque de expansão ou latão) com maior porcentagem de casos positivos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Brucelose

Brucelose são infecções causadas por bactérias do gênero *Brucella* e que acometem varias espécies animais, inclusive o homem, (RADOSTITS et al., 2012).

As espécies de *Brucella* têm a capacidade de infectar e multiplicar-se em células fagocíticas (JONES & WINTER, 1992) e não-fagocíticas (DETILLEUX et al., 1990). No interior de macrófagos, têm a capacidade de inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo e evitar a sua destruição pelos reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio (PIZARRO-CERDÁ et al., 1998). Dessa forma, a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência de *Brucella abortus* no organismo (GORVEL & MORENO, 2002). Outra célula-alvo da *B. abortus* é o trofoblasto, que é a principal célula da porção fetal da placenta (SANTOS et al., 2005).

Essas infecções tendem a se localizar no sistema retículo endotelial e no trato genital. Os sinais clínicos mais comuns consistem em abortos em fêmeas, epididimite e orquite em machos (HIRSH & ZEE, 2003).

A brucelose também é descrita como aborto epidêmico, em suínos; febre ondulante, febre de malta, doença de bang, febre mediterrânea, febre de Gibraltar, doença das mil faces, em humanos; aborto infeccioso, em bovinos; e mal da cernelha, em equídeos (BEZERRA, 2011).

3.2 Etiologia

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são cocobacilos ou bastonetes curtos com 0,5 a 0,7 µm de diâmetro e 0,6 a 1,5 µm de comprimento, visualizados com maior intensidade isolados e, por vezes, em cadeias curtas. São carecidas de cápsula, não formadoras de esporos e sem flagelo na sua estrutura (Almeida, 2009).

São bactérias gram-negativas, e são também Ziehl-Neelsen modificado positivo, capazes de infectar muitas espécies de animais, além do homem. São agentes patogênicos intracelulares facultativos com a capacidade de evasão das defesas do hospedeiro e dos agentes quimioterápicos (FERNANDES, 2012).

De acordo com Lopes & Zappa (2013), a bactéria apresenta-se morfologicamente nas formas lisa e rugosa. As formas lisas possuem na composição de sua membrana celular o lipídeo A, núcleo oligossacárideo e cadeia O, enquanto as rugosas possuem apenas lipídeo A e parte do núcleo oligossacárideo. Em algumas espécies de *Brucella* spp., ocorre mutação para a forma rugosa, a qual é menos virulenta.

A bactéria não possui fatores clássicos de virulência, como exotoxinas, endotoxinas e a patogenicidade da LPS (lipopolissacarídeo). A bactéria possui a capacidade de invadir e persistir no hospedeiro humano por meio da inibição da apoptose (Almeida, 2009).

Dentro do gênero *Brucella*, são reconhecidas seis espécies autônomas, cada uma com seu hospedeiro: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (cães) e *Brucella neotomae* (rato do deserto). Três novas espécies foram recentemente incluídas no gênero *Brucella*: *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas de mamíferos marinhos como cetáceos (golfinhos e baleias) e pinípedes (focas), como hospedeiros preferenciais respectivamente, e *B. microti* isolada da ratazana comum (MAQUART et al., 2009). As três espécies importantes, também denominadas clássicas, são subdivididas em biovariedades ou biovares: *B. abortus* – 7 biovares; *B. melitensis* – 3 biovares; *B. suis* – 5 biovares (BRASIL, 2006).

A espécie mais largamente distribuída no mundo e mais importante é a *B. abortus*, principalmente por causar infecção ao homem (ALMEIDA, 2009).

As brucelas são facilmente destruídas pelo calor, quando em baixa concentração. A pasteurização e os métodos de esterilização a altas temperaturas, e até

mesmo a fervura, extinguem-nas. No entanto, em produtos não pasteurizados, a bactéria pode resistir por vários meses (BANDEIRA, 2011).

Lopes & Zappa (2013) afirmam que a constituição da parede celular das brucelas fornece resistência às intempéries e, quando há associação de umidade, sombreamento e baixas temperaturas, a sobrevivência do agente no meio ambiente é ampliada. No entanto, a luz solar direta diminui drasticamente sua sobrevivência.

Os desinfetantes mais indicados para a eliminação do microrganismo são produtos à base de cloro (2,5%), soda cáustica a 2-3% e cal hidratada a 20%, com efeito mais ativo no tempo mínimo de exposição de uma hora. Álcool 70 graus tem ação imediata e a inativação pelo calor é bastante eficaz quando bem realizada. Os desinfetantes amoniacais, por sua vez, não têm boa atividade contra a *B. abortus* (BEZERRA, 2011).

As bactérias deste gênero, embora permaneçam no ambiente, não podem se multiplicar nele. A sua resistência diminui quando a temperatura e a luz solar direta são aumentadas ou quando a umidade diminui. Em esterco líquido, a sobrevivência da *Brucella* sp., é inversamente proporcional à temperatura do esterco e, se a temperatura for de 15 °C, sua sobrevivência pode ser de até 8 meses, ao passo que, se a temperatura do material for de 45° – 50 °C, a bactéria somente resiste por quatro horas (BRASIL, 2006). Em secreções uterinas, as bactérias podem resistir por até 200 dias ou mais; em fetos abortados, resistem até oito meses, dependendo das condições ambientais; em urina de bovinos a *B. abortus*, sobrevive até quatro dias; sob refrigeração em derivados do leite, como queijo, pode sobreviver até 32 dias (BEZERRA, 2011); em tecidos congelados, sua viabilidade é aumentada, podendo resistir por muito mais tempo (LOPES & ZAPPA, 2013).

3.3 Epidemiologia

A brucelose é uma das mais importantes zoonoses bacterianas e, embora seja uma doença subdiagnosticada e subestimada, mais de meio milhão de casos novos é identificado anualmente em humanos, especialmente em países em desenvolvimento. É uma doença considerada hiperendêmica em áreas do Mediterrâneo, da Península Arábica, da Índia, do México, da América Central e da América do Sul (DIVE/SES/SC, 2012).

Segundo Lopes & Zappa (2013) com adoção de medidas de controle, alguns países têm mantido a brucelose sob controle, reduzindo sua incidência, como é o caso da França e dos Estados Unidos da América. No Japão, no Canadá, na Austrália e em vários países europeus, a doença foi erradicada com a adoção de medidas iniciadas há mais de 20 anos.

No Brasil, a prevalência de animais diagnosticados com a doença manteve-se entre 4% e 5% no período entre 1988 e 1998, segundo dados oficiais publicados no Boletim de Defesa Sanitária Animal (BRASIL, 2006). Em 1975, foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5%; e Norte, 4,1% (BRASIL, 2005).

Vários inquéritos sorológicos realizados no Brasil em bovinos apontaram mais de 10% de soroprevalência. A doença somente se comporta como epidemia, acarretando surto de abortos, se recém-ingressa em uma criação. Entretanto, a enfermidade não causa mortalidade em animais adultos, apenas é acrescida se os fetos abortados ou neonatos doentes que venham a morrer forem computados (LOPES & ZAPPA, 2013).

A enfermidade atinge bovinos em todas as idades, porém é mais frequente em animais sexualmente maduros e em bovinos leiteiros. Os surtos de abortamentos ocorrem mais frequentemente em novilhas não vacinadas e em fases posteriores ao quinto mês de gestação (RADOSTIS et al., 2002).

Portanto, a soroprevalência tende a aumentar com o número de animais sexualmente maduros, ou seja, com a idade do animal, além de outros fatores, como a duração prolongada da resposta humoral nos animais infectados e a exposição prolongada ao agente, principalmente onde as fêmeas gestantes não são separadas do rebanho, constituindo assim fonte de infecção no momento do parto (FERNANDES, 2012).

A doença no homem também tem caráter profissional, ou seja, estão sujeitas à infecção pessoas que trabalham diretamente com os animais infectados (tratadores, proprietários, veterinários) ou que trabalham com produtos de origem animal (funcionários de matadouros, laboratoristas). Sorologias realizadas em matadouros indicaram a prevalência de brucelose humana nesse setor: Bahia, 10,58% de reagentes em 1972; Belo Horizonte, 2,1% em 1984; e Maranhão, 2,17% em 1995 (BEVILACQUA, 2008).

3.4 Transmissão

A transmissão do agente etiológico ocorre com mais intensidade por contato indireto com o agente, por ingestão de água, forragem, concentrado e qualquer outro alimento contaminado. O contato direto ocorre com menor frequência e é de difícil manejo, visto que as vacas possuem a característica de lambar membranas fetais, fetos abortados e bezerros recém-nascidos, além do hábito de lambar os órgãos genitais de outras vacas (BEZERRA, 2011).

O agente se localiza no organismo do animal com maior frequência em linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, útero e úbere. A *Brucella* sp. é eliminada em fluidos e anexos fetais durante o parto ou abortamento e também por leite e sêmen (BRASIL, 2006).

Monteiro et al.. (2006) destaca que touros usados para cobertura natural não têm papel de evidência na dispersão da doença, já que o sêmen é depositado no interior da vagina, onde o ambiente, como o pH, são desfavoráveis ao desenvolvimento da bactéria, no entanto, a bactéria é transmitida via inseminação artificial, uma vez que o sêmen infectado é depositado no interior do útero.

Por esse motivo, um touro infectado não pode ser utilizado como doador de sêmen, pois o sêmen introduzido diretamente no útero permite a infecção da fêmea com pequenas quantidades da bactéria, tornando a inseminação importante via de transmissão e eficiente forma de difusão do agente em rebanhos (BRASIL, 2006).

Segundo Radostits et al. (2002), a infecção congênita pode ocorrer, porém em frequência muito baixa, uma vez que a infecção ocorre no útero e permanece latente no bezerro durante o início de vida. Assim, o animal permanece sorologicamente negativo até o seu primeiro parto, quando começa a eliminar o microrganismo. Até novilhas vacinadas com infecção congênita podem albergar uma infecção latente, que se torna ativa na fase adulta.

Outros animais com importância na epidemiologia da brucelose bovina são os equídeos, que podem exibir lesões articulares abertas na cernelha; os cães, que podem abortar pela infecção; e os saprófagos, pela probabilidade de levar restos de placenta ou feto contaminados de um lugar a outro (BRASIL, 2006).

O principal meio de entrada da brucelose em uma propriedade é a introdução de animais contaminados. Quanto maior a frequência de introdução de animais, maior o risco de contaminação do rebanho. Por esse motivo, não se deve introduzir animais cuja

condição sanitária é desconhecida (BRASIL, 2006). No homem, a transmissão ocorre principalmente por contato da conjuntiva ou pele lesionada com material infectado (sangue, urina, secreções, fetos abortados, restos placentários), pela ingestão de produtos contaminados, sobretudo lácteos, e não pasteurizados, inclusive queijos. A inoculação acidental durante a vacinação dos animais também pode ocorrer na transmissão e, nessa situação, caracteriza a brucelose como doença relacionada ao trabalho (DIVE/SES/SC, 2012).

3.5 Patogenia

A *Brucella* sp. entra no organismo, na maioria das vezes, pela mucosa oral ou nasal. Em seguida, se multiplica e é fagocitada. Contudo, as bactérias sobrevivem dentro dos macrófagos, pois têm a capacidade de resistir aos mecanismos de destruição das células fagocitárias (BRASIL, 2006).

O trato gastrointestinal é a via mais comum de infecção por *Brucella abortus* (ACKERMANN et al., 1988; KO & SPLITTER, 2003). Após a ingestão, as bactérias são endocitadas pelas células epiteliais do intestino delgado, particularmente as células M das placas de Peyer (ACKERMANN et al., 1988). Após a invasão inicial, o agente se localiza inicialmente nos linfonodos, que drenam a área e se espalham para diferentes tecidos linfoides, como o baço e os linfonodos mamários e ilíacos (RADOSTITS et al., 2002).

Esses órgãos preferenciais possuem grande disponibilidade de elementos imprescindíveis ao metabolismo da bactéria. A presença do agente no órgão desenvolve alterações inflamatórias, levando a granulomas e induzindo à esplenomegalia ou hepatomegalia (BEZERRA, 2011).

Segundo Olinto (2010), não há alterações inflamatórias e necróticas nos machos. *B. abortus*, além dos linfonodos, também tem predileção por útero prenhe, úbere, testículos, glândulas sexuais masculinas acessórias, cápsulas articulares e membranas sinoviais.

Em úberes de vacas adultas, não há alterações clínicas, todavia esses úberes são importantes fontes de reinfecção uterina, já que um úbere contaminado produz leite contaminado, que constitui fonte de infecção para bezerros e principalmente para o homem (ALVES & VILLAR et al., 2011).

As brucelas infectam o útero gestante por via hematógena e multiplicam-se inicialmente no trofoblasto do placentoma, infectando igualmente as células adjacentes, ocasionando reação inflamatória da placenta e levando também a infecção fetal (BRASIL, 2006).

O feto produz uma substância denominada eritritol, que tem a capacidade de estimular o crescimento de *B. abortus* e ocorre naturalmente em grande concentração na placenta e nos fluidos fetais, e é a provável responsável pela predileção da infecção por este órgão (LOPES & ZAPPA, 2013).

O eritritol é um álcool poli-hídrico que atua como fator de crescimento (OLINTO, 2010). Esse álcool não é metabolizado pela bactéria, diferentemente da eritrose, que é um metabólito do eritritol, açúcar simples resultante do desdobramento da eritrose. A lise da eritrose em eritrose é feita pela enzima D-eritrose-1-fosfato de-hidrogenase produzida por *Brucella* sp., exceto pela estirpe B19 (Bezerra, 2011).

As lesões placentárias ocasionadas pela bactéria raramente abrangem todos os placentomas. Somente parte deles é afetada e as lesões inflamatório-necróticas impedem o acesso de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto e geram a infecção maciça do feto, levando ao aborto (BRASIL, 2006).

O principal sinal clínico é o aborto, que ocorre no terço final da gestação, aproximadamente no sétimo mês de gestação (BRASIL, 2006; LOPES & ZAPPA, 2013). Em casos agudos em que há maior necrose, é maior a chance de abortamento, porém, quando a necrose é menor, há deposição de fibrina, levando a um aborto tardio, retenção de placenta ou gestação a termo, entretanto, neste caso, os animais podem nascer fracos e podem vir a morrer em alguns dias.

A doença gera também a diminuição da produção de leite, devido à ocorrência de parto prematuro e à infertilidade. No entanto, os problemas de fertilidade normalmente são temporários, pois as fêmeas abortam somente uma vez ou nem chegam a ser comprometidas (FERNANDES, 2012).

Segundo Bevilacqua (2008), após o aborto, ocorre retenção placentária e as células cotiledonárias apresentam imensas quantidades do agente. O feto abortado normalmente está um pouco edematoso e pode apresentar na cavidade abdominal e torácica um líquido sorrossanguinolento, além de broncopneumonia que microscopicamente apresenta predomínio amplo de macrófagos sobre o componente neutrófilo.

No touro, ocorrem geralmente orquite e epididimite e aumento de uma ou de ambas as bolsas escrotais, acometidas por edema doloroso e agudo. As vesículas seminais, quando acometidas, podem apresentar aumento de volume, que pode ser detectado na palpação retal. Esses touros normalmente ficam estéreis quando a orquite é aguda, mas poderão retornar à fertilidade normal se um dos testículo estiver intacto (RADOSTITS et al., 2002).

Quando a brucelose acomete o aparelho locomotor, gera infecções articulares levando a bursite, sobretudo nas articulações carpianas, tarsianas, vértebras torácicas e lombares, podendo também atingir a medula óssea e a bainha dos tendões (LOPES & ZAPPA, 2013).

Segundo Almeida (2009), quando a contaminação ocorre pela alimentação, os sintomas são semelhantes ao da febre tifoide, no entanto as manifestações gastrointestinais não sobrepõem às sistêmicas. *Brucella* sp., também é uma possível causadora de colecistite aguda e crônica, ileíte, colite, pancreatite e peritonite bacteriana espontânea.

Quando a doença se apresenta de forma aguda, os sintomas consistem em astenia, fadiga, constipação, anorexia, cefaleia, artralgia, complicações no sistema nervoso levando a neurastenia, depressão e impotência sexual, que podem evoluir, levando a artrites, espondilites, bursites, reumatismo e inflamação na medula óssea, no fígado, baço e sistema linfático (BEZERRA, 2011).

3.6. Diagnóstico

O diagnóstico clínico e as evidências epidemiológicas, como orquite, histórico de abortamento no terço final da gestação e contato com material fetal, são usados apenas como suspeita, pois não têm valor confirmatório (OLINTO, 2010).

Os testes utilizados para o diagnóstico de brucelose indicados pelo *Office International des Epizooties* (OIE), são o teste de rosa de bengala (RBT) e o teste de fixação do complemento (CFT). O teste do anel em leite (TAL) é largamente utilizado como teste de rastreio em bovinos (OIE, 2000).

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e o teste do anel em leite (TAL) como testes de triagem e o 2-mercaptoetanol (2-ME) e a fixação de complemento (FC) como testes confirmatórios (BRASIL, 2006).

O diagnóstico laboratorial da brucelose pode ser realizado por método direto, bacteriológico, que se baseia no isolamento do agente a partir de tecidos de fetos abortados, da placenta, de exsudados vaginais, gânglios, leite e sêmen, e também por métodos indiretos, que consistem na detecção de anticorpos no soro, no leite, no plasma seminal ou no muco vaginal e são mais empregados no País (OLINTO, 2010).

Os testes adotados pelo programa brasileiro têm como vantagem o seu baixo custo, o que permite uma aplicação mais ampla. A combinação dos testes de SAL e 2-ME têm como desvantagens o longo tempo para a obtenção do resultado (48 horas), o gasto de grande quantidade de reagentes, ocupando grandes espaços quando são testadas muitas amostras, o uso de substância tóxica e a necessidade de as amostras de soro estar em condições ótimas de conservação (CHAPPEL, 1989). A reação de fixação de complemento (RFC) tem como principais desvantagens: a técnica, que é bastante trabalhosa e exige equipe altamente treinada para a obtenção de um resultado confiável; o uso de reagentes lábeis que precisam ser constantemente preparados e titulados; a ocorrência de atividade anticomplementar, principalmente em amostras mal conservadas; e a ocorrência de efeito prozona, que pode levar à obtenção de resultados falsos-negativos; e o fato que a maioria desses fatores pode comprometer a precisão (reprodutibilidade e repetibilidade) da técnica (CHAPPEL, 1989).

Considerando essas desvantagens, outras opções podem ser adotadas por um programa, entre elas, o teste de polarização fluorescente (TPF), que se baseia na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (marcado com fluorocromo) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Uma molécula menor gira aleatoriamente em velocidade maior, resultando em rápida despolarização da luz, ao passo que um complexo maior gira mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre a uma taxa mais reduzida. Essa mudança na despolarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente (NIELSEN & GALL, 2001).

3.6.1 Diagnóstico bacteriológico (direto)

Segundo Bezerra (2011), em testes para diagnóstico de brucelose, deve-se observar que *Brucella* sp. é um microrganismo classificado como de nível 3 de biossegurança e requer que, em toda manipulação de material suspeito de contaminação ou de culturas, sejam utilizados equipamentos de proteção individual (luvas, máscara,

óculos, gorro e aventais de mangas longas) e, no laboratório, equipamentos de proteção coletiva, fluxo laminar e sala com pressão negativa.

De acordo com o PNCEBT, a manipulação de materiais infectados ou potencialmente infectados com *Brucella* sp. é uma importante via de transmissão ao homem (BRASIL, 2006).

Quando não há nenhum erro durante a coleta, o transporte e o manuseio da amostra e os exames são realizadas em laboratórios capacitados e credenciados, o isolamento e a identificação de *Brucella* sp. tem apresentado bons resultados (BEZERRA, 2011).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica capaz de detectar um segmento de DNA específico de *B. abortus* em materiais suspeitos e pode ser utilizada como alternativa ou como complemento ao isolamento. Entre suas vantagens, destaca-se a rapidez em comparação ao isolamento e à alta especificidade, uma vez que são utilizados *primers* específicos com sequências de DNA (LOPES & ZAPPA, 2013).

O isolamento de *Brucella* sp. é comumente utilizado no diagnóstico da enfermidade. É uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, na monitorização do progresso de um programa de vacinação e proporciona diagnóstico definitivo, ainda que não se obtenham culturas positivas em todos os animais infectados (FERNANDES, 2012).

3.6.2 Diagnóstico sorológico (indireto)

Segundo Olinto (2010), ainda que o isolamento do agente forneça um diagnóstico definitivo e incontestável de brucelose, o procedimento é oneroso, lento e exige recursos laboratoriais nem sempre disponíveis, o que inviabiliza sua aplicação em larga escala, inibindo seu uso em programas de controle da doença.

Já o método sorológico (indireto) é eficiente, econômico, rápido e permite o rastreio de várias amostras com sensibilidade suficiente para detectar grande volume de animais infectados, que depois devem ser testados utilizando-se testes confirmatórios (FERNANDES, 2012). Os testes sorológicos, no entanto, não têm sensibilidade absoluta. Em animais recentemente vacinados ou vacinados tardiamente infectados com bactérias contendo antígenos semelhantes aos de *Brucella*, assim como *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, os antígenos podem ser detectados pela

sorologia, enquanto, em animais recém-infectados ou com infecção crônica, os testes podem não ser reativos (BEVILACQUA, 2008).

3.6.2.1 Antígeno acidificado tamponado (AAT)

O teste de antígeno acidificado tamponado é muito sensível e de fácil execução e, como descrito anteriormente, é um teste de triagem realizado por médicos veterinários habilitados ou por laboratórios credenciados. As amostras reagentes poderão ser submetidas ao 2-mercaptoetanol, um teste confirmatório (BRASIL, 2006).

O teste consiste em soroaglutinação em uma placa, com quadrados delimitados de 4 cm em que o antígeno é tamponado em pH ácido, diminuindo a atividade da IgM e tornando a prova seletiva para IgG1. A presença de aglutinação qualifica o soro como reagente e a falta de aglutinação, como não reagente (CASTRO, 2010; BANDEIRA, 2011).

3.6.2.2 Teste do anel em leite (TAL)

O teste do anel em leite foi criado para ser aplicado em combinações de leite de vários animais, já que a baixa concentração celular do antígeno (4%) o torna muito sensível. O antígeno empregado mais frequentemente é corado com hematoxilina, que confere a cor azul característica à reação positiva (BRASIL, 2006). O teste deve ser executado por médicos veterinários habilitados ou por laboratórios credenciados (LOPES & ZAPPA, 2013).

Entre as vantagens desse teste, destacam-se a praticidade, segurança, simplicidade e o custo, uma vez que a implantação do exame em uma área é de 10% do custo de implantação de outro teste sorológico com eficácia semelhante (CHIELLE et al., 1989; FRAZER, 1996).

Segundo Dasso (2006), a concordância entre o TAL, o AAT e o 2-ME foi bastante significativa, comprovando que o TAL é também um teste de alta sensibilidade, uma vez que todas as amostras positivas foram positivas ao 2-ME, o que representa 100% de sensibilidade, reafirmando seu uso como teste de triagem para o diagnóstico de brucelose.

De acordo com Silva Júnior et al. (2007), o TAL realizado em amostras individuais de leite apresenta sensibilidade de 87,5%, resultado similar ao encontrado

por Zoghi et al. (1992), que detectaram, entre 1956 animais sorologicamente positivos, 1.632 amostras de leite positivas ao teste, caracterizando 83,4% de sensibilidade. Esses autores demonstraram ainda especificidade de 78% para o TAL em amostras individuais, diferente do resultado observado por Huber & Nicoletti (1986), que avaliaram o TAL em 1003 amostras individuais de leite e caracterizaram especificidade de 57,5%.

A discrepância pode ser justificada pelos diferentes métodos utilizados para definição da especificidade, uma vez que esses autores avaliaram a técnica frente à fixação de complemento (SILVA JÚNIOR et al., 2007).

A baixa especificidade do TAL em amostras individuais de leite foi descrita também por Olascoaga (1976) e Heck et al. (1980), que consideraram que, em função da baixa especificidade do teste individual, os animais positivos ao TAL deveriam ser reavaliados em outras provas sorológicas.

Utilizando o isolamento da bactéria como teste padrão-ouro, o TAL apresenta especificidade de 87%. Os resultados falsos-positivos encontrados são em decorrência da presença de anticorpos vacinais, de leucócitos e células de descamação da glândula mamária, encontrados normalmente em leite proveniente de animais com mastite ou colostro. Essas reações falsos-positivas podem estar associadas à presença de IgM, já que essa imunoglobulina, ao lado da IgA, é responsável pela reação do TAL (DASSO, 2006).

Em pesquisas realizadas por Silva Junior et al. (2010), os resultados do TAL em amostras de leite de latões demonstraram sensibilidade de 84,2% e especificidade de 97,1%, comprovando ser igualmente um excelente teste de triagem para a brucelose bovina.

De acordo com Castro (2010), para a realização do TAL, adicionam-se à amostra de leite 30 µL de antígeno. A amostra é homogeneizada e incubada por 60 minutos a 37 °C e, após este período, realiza-se a leitura. Se houver anticorpos contra *B. abortus* no leite, eles serão combinados com o antígeno, formando um complexo antígeno anticorpo. O IgG que se encontra livre no leite auxilia nessa formação e na conexão dos glóbulos de gordura, realçando a coloração do anel (DASSO, 2006).

O resultado do teste é considerado positivo quando a intensidade da cor do anel for igual ou maior que a da coluna de leite e negativo quando a intensidade da cor do anel for menor que a da coluna de leite. Em casos de positividade, os animais do

estabelecimento de criação deverão ser submetidos a testes sorológicos individuais para diagnóstico de brucelose (BRASIL, 2009).

3.6.2.3 Teste de soroaglutinação em tubos (SAT)

O teste de soroaglutinação em tubos (SAT) é também denominado prova lenta, uma vez que a leitura dos resultados é realizada em 48 horas. Apesar de ser a prova sorológica mais antiga, ainda hoje é muito empregada. É uma prova padronizada frente a um soro padrão internacional e cujo resultado é expresso em unidades internacionais. É empregada em associação com o teste do 2-mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina (BRASIL, 2006).

O antígeno utilizado nessa prova apresenta concentração celular de 4,5% e pH 6,4 a 7,0 e reage com anticorpos das classes IgG e IgM. Os animais vacinados com B19 acima de 8 meses podem apresentar títulos para essa prova por um longo período, resultando em reações falsos-positivas (CASTRO, 2010).

3.6.2.4 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)

O teste do 2-mercaptoetanol ou 2-ME consiste no tratamento prévio do soro com uma solução que contém 2-mercaptoetanol e que tem a propriedade de extinguir ligações da molécula de IgM, atenuando a capacidade aglutinante dessa classe de imunoglobulina, aumentando a especificidade do teste. O teste sorológico mais específico é executado por laboratórios credenciados (LOPES & ZAPPA, 2013).

O antígeno utilizado é o mesmo da prova lenta, porém detecta somente a presença de imunoglobulinas da classe IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica (BRASIL, 2006; CASTRO, 2010).

Esse teste deve ser sempre executado em paralelo com a prova lenta em tubos, uma vez que soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta (BRASIL, 2006).

A leitura do teste 2-mercaptoetanol é realizada por meio de uma fonte de luz fria indireta contra um fundo escuro e opaco. Após agitação suave dos tubos, a interpretação do exame baseia-se no grau de aglutinação do antígeno e na firmeza dos grumos. A classificação do grau de aglutinação deve ser mensurada como: completo, quando o líquido apresenta-se translúcido e a agitação não rompe os grumos;

incompleta, quando o líquido mostra-se parcialmente translúcido e uma suave agitação rompe os grumos; e negativa, quando o líquido surge opaco ou turvo e uma agitação suave não apresenta a presença de depósito (CASTRO, 2010).

3.6.2.5 Teste de fixação de complemento (CFT)

O teste de fixação de complemento é realizado somente em laboratórios oficiais credenciados para efeito de trânsito internacional e é o teste de referência indicado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). É usado como teste confirmatório em animais reagentes ao teste de triagem ou para diagnóstico de casos inconclusivos ao teste do 2-mercaptoetanol, pois detecta especialmente IgG1, principal imunoglobulina resultante da contaminação por *Brucella* sp. (BRASIL, 2006; LOPES & ZAPPA, 2013).

Como desvantagens, destacam-se o seu custo e sua complexidade, tornando-se um diagnóstico difícil, lento e caro e de difícil aplicação em áreas endêmicas e empobrecidas. Nesse teste, também podem ocorrer o fenômeno prozona, quando se testam soros com baixas diluições, ou reações anticomplementares, que ocasionam teste nulo ou falso-positivo quando existem bactérias ou outros fatores que fixam o complemento, mesmo na ausência do *Brucella* (FERNANDES, 2012).

Em animais vacinados acima de 8 meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente do que os aglutinantes, diminuindo a ocorrência de falso positivo neste teste (BRASIL, 2006).

3.7 Controle e profilaxia

As estratégias para o controle da brucelose têm como objetivo reduzir gradualmente o número de focos da enfermidade e normalmente isso é feito com a vacinação das fêmeas, controle de trânsito dos animais de reprodução e a certificação de rebanhos livres, realizada pelo diagnóstico metódico dos animais de reprodução, seguido do sacrifício dos animais soropositivos, combinados com medidas ambientais (LOPES & ZAPPA, 2013).

O esquema vacinal consiste na vacinação de fêmeas entre 3 e 8 meses de idade com apenas uma dose da vacina, administrada aos 5 meses de idade. Normalmente esse esquema de vacinação confere imunidade por toda a vida do animal, ainda que todas as

fêmeas vacinadas diminuíam seus títulos de anticorpos entre 16 e 18 meses (OLINTO, 2010).

Como medida de controle ambiental, a implantação de programas de desinfecção e a utilização de piquetes de parição são ações simples e necessárias para o controle da doença e que têm como resultado a diminuição da quantidade de brucelas vivas presentes no ambiente, diminuindo a dose de desafio e, consequentemente, aumentando os índices de proteção vacinal (BRASIL, 2006). Para o sucesso desse controle, vários fatores devem ser considerados: prevalência; tipo de regime produtivo praticado; identificação animal e vigilância; disponibilidade e qualidade de vacinas; disponibilidade de recursos; autoridade legal; cooperação de todos os setores; entre muitos outros (FERNANDES, 2012).

A sensibilização e a participação da comunidade são indispensáveis. Em propriedades em que a doença não está presente, o cuidado de não deixar a doença atingir o rebanho é de responsabilidade de cada produtor, portanto, no momento da compra, os animais devem ser submetidos ao teste diagnóstico para a brucelose (DIVE/SES/SC, 2012).

As fêmeas das espécies bovina e bubalina devem ser obrigatoriamente vacinadas no intervalo dos 3 aos 8 meses de idade. Após a vacinação, as fêmeas devem ser marcadas com ferro candente, no lado esquerdo da cara, com um V, seguido do algarismo final do ano de vacinação (BRASIL, 2009). A marcação auxilia na monitoração de abortos induzidos pela vacinação e também evita a testagem sorológica e a revacinação dos animais (FERNANDES, 2012).

A vacinação, segundo Fernandes (2012), diminui a incidência da doença clínica e a redução do número de organismos excretados por animais infectados. Os produtores aderem mais facilmente à vacinação como método de controle do que à prática de medidas de higiene e à remoção e ao abate dos animais soropositivos.

O estado de Santa Catarina, após o estudo epidemiológico realizado em 2002, que revelou apenas 0,022% de animais infectados, foi excluído da obrigatoriedade da vacinação contra a brucelose (BRASIL, 2009).

Várias vacinas têm sido desenvolvidas, desde a identificação do agente etiológico da brucelose, com o objetivo de intervir o mínimo possível no diagnóstico da doença. No entanto, muitas dessas vacinas mostraram-se pouco protetoras, assim como as vacinas mortas. As vacinas vivas atenuadas são as que efetivamente têm melhores resultados e são empregadas nos programas de controle da brucelose. Duas delas,

indicadas pela OIE, a B19 e a vacina não-indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51), são capazes de induzir boa imunidade celular (BRASIL, 2006).

A vacina B19 foi desenvolvida em 1923 a partir de uma amostra de *B. abortus* lisa, isolada do leite de uma vaca Jersey. A amostra foi acidentalmente esquecida por mais de um ano à temperatura ambiente, perdendo parte da virulência e, desde a década de 1930, tem sido utilizada como vacina. Vários países que erradicaram a enfermidade utilizaram essa vacina (BRASIL, 2006).

A B19 é uma vacina viva atenuada, única permitida e aprovada para vacinação utilizada no Brasil. Ela induz uma proteção eficiente e duradoura. A vacinação de machos e de fêmeas em gestação não é recomendada (LOPES & ZAPPA, 2013).

Ao se realizar a vacinação dos animais, devem ser tomados certos cuidados quanto à proteção individual, como uso de óculos de proteção e luvas, e também quanto ao descarte de seringas e frascos de vacinas (BRASIL, 2006), uma vez que o contato com a vacina pode acarretar sinovite e febre ondulante na espécie humana (CASTRO, 2010).

A principal desvantagem da vacinação é a interferência em testes de diagnóstico imunológico enquanto os anticorpos produzidos contra o polissacarídeo O, aparente em sua composição, reagem com o antígeno dos testes de diagnóstico sorológicos (CASTRO, 2010).

A RB51 foi desenvolvida em meados dos anos 1990, a partir de uma amostra de *B. abortus* rugosa, atenuada, proveniente de cepa 2308, que atenuou sua virulência após sofrer inúmeras passagens em meio contendo rifampicina. Essa vacina não produz formação de anticorpos contra LPS liso, por ser rugosa, assim, não intervém no diagnóstico sorológico da doença. Em áreas de alta e baixa prevalência, no campo, a imunidade vacinal é igual ou superior à induzida pela B-19 (LOPES & ZAPPA, 2013). Atualmente é a vacina oficial do programa de controle de brucelose dos EUA, do México e do Chile, além de outros países onde tem sido utilizada. No Brasil, será empregada para a vacinação estratégica de fêmeas adultas e com mais de 8 meses. Para o seu manuseio, devem ser utilizadas as mesmas precauções adotadas para a B19, já mencionadas (BRASIL, 2006).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal em 2001, por meio da Instrução Normativa nº 2, de 10 de Janeiro de 2001. O programa tem como objetivos reduzir a prevalência e a incidência da brucelose e certificar estabelecimentos

de criação cujo controle e erradicação, sejam executados com rigor e eficácia, com o propósito de aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública (BRASIL, 2009; CASTRO, 2010).

Segundo Castro (2010), o programa é composto por medidas sanitárias compulsórias, que compreendem a vacinação de bezerras com idade entre 3 e 8 meses e o controle do trânsito de animais para reprodução. O trânsito interestadual de animais para reprodução só é tolerado com a exposição de teste negativo para brucelose, com validade de 60 dias, e comprovante de vacinação incorporado na guia de trânsito animal (GTA). Os animais devem ser testados no período de até 60 dias antes do transporte para a participação em exposições ou leilões. Não é necessária a realização do teste se os animais forem destinados ao abate.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em três etapas: coleta; conservação; incubação e leitura. No cálculo do tamanho da amostra consideraram-se um limite de confiança de 95% e um erro de estimativa de prevalência de 5% (ZAR, 1996), conforme no Anexo 1. Foram coletados de 423 propriedades amostras de leite *in natura*, de aproximadamente 10 mL, de três formas distintas: diretamente do tanque de expansão; do latão; ou da plataforma de leite, com o auxílio de uma pipeta estéril. A coleta foi realizada em propriedades leiteiras dos municípios de Unaí e Buritis, em Minas Gerais, fornecedores de leite à CAPUL (Cooperativa Produtores de Leite de Unaí) e ao Laticínio de Buritis, Minas Gerais (Figura 1).

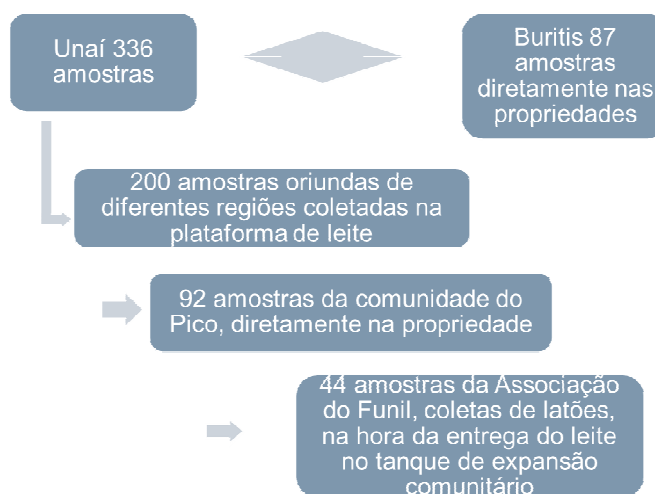


Figura 1 - Localidades e formas de coleta das amostras.

A coleta foi realizada no período de 5 de fevereiro a 3 de abril de 2014, diretamente nas propriedades rurais e nas plataformas de recebimento de leite. Foram coletadas no município de Buritis 87 amostras, diretamente nas propriedades, e em Unaí 336, amostras. Dessas 336 amostras, 200 foram oriundas de diferentes regiões e coletadas na plataforma de leite; 92 foram coletadas diretamente nas propriedades da comunidade do Pico, e 44 foram provenientes da Associação do Funil, coletadas na hora da entrega do leite no tanque de expansão comunitário. Nas Figuras 2 e 3, pode-se observar a região noroeste mineira em que foram realizadas as coletas das amostras de leite para análise.

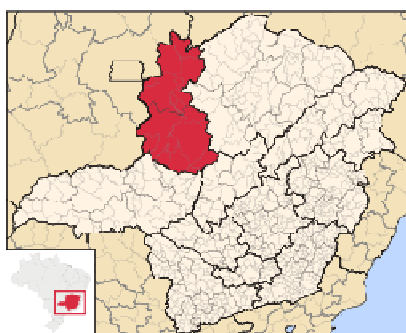


Figura 2 - Noroeste mineiro.



Figura 3 - Municípios de Unaí e Buritis, locais de coleta de leite para análise.

Para a coleta de amostras, primeiramente o leite do tanque foi homogeneizado com o auxílio de um agitador automático. Em propriedades com latão manual, a homogeneização foi realizada manualmente com pelo menos sete movimentos e, por meio de um coletor de aço inoxidável de 250 mL, foi retirada uma amostra de 10 mL, que foi armazenada em frascos plásticos previamente esterilizados e identificados com a matrícula da propriedade na Cooperativa (Figura 4).



Figura 4 - Amostras de leite em frascos previamente esterilizados e identificados.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório da Cooperativa em caixas isotérmicas em temperatura máxima de 10 °C, mantidas com gelo natural ou gelo artificial reutilizável, para realização do teste do anel em leite (TAL), onde permaneceram sob refrigeração em torno de 2 a 7 °C por 24 horas.

A técnica desenvolvida neste trabalho foi baseada nas normas do MAPA, porém com padronização do volume de leite de todas as amostras em 3 mL, independentemente do tamanho do rebanho, uma vez que parte das amostras foi coletada na plataforma de leite dos laticínios e não foi possível mensurar o tamanho do rebanho.

As 223 amostras coletadas diretamente nas propriedades leiteiras foram avaliadas quanto à relação de positividade e sua relação com a forma de armazenamento do leite (tanque ou latão) e com o volume de leite produzido, dividindo-se, dessa forma, as propriedades em três níveis de produção: até 300 L; de 301 a 500 L; e de 501 a 3000 L.

Uma hora antes da realização dos exames, com auxílio de aparelho homogeneizador do tipo Vortex, cada amostra, agora de 3 mL, foi homogeneizada e, por meio de uma pipeta de 0,03 µL, foi acrescida de 0,03 µL do antígeno Ring Test (Figura 5A), e novamente homogeneizada (Figura 5B).

Os tubos foram colocados em estufa regulada para temperatura de 37 °C durante 60 minutos seguidos inversão lenta do tubo. Após esse período de incubação, foram realizadas as leituras do teste, de acordo com a seguinte interpretação, realizada também por Moreira & Mallman (2002): 1) Anel inteiramente corado e com cerca de 2 mm ou mais de espessura sobre a coluna de leite completamente descorada – POSITIVO (+++); 2) Anel semelhante ao descrito, porém com a coluna de leite não totalmente descorada - POSITIVO (++); 3) Anel sem descoloramento apreciável da

coluna de leite, coloração quase idêntica à do anel de creme e da coluna de leite - SUSPEITO; 4) O anel branco, de creme, no alto de uma coluna de leite que se apresenta corada pelo antígeno – NEGATIVO (Figuras 6 e 7).



Figura 5 - (A) Antígeno para diagnóstico da prova do anel em leite; e (B) tubos de ensaio com amostras de leite e 0,03 μL do antígeno Ring Test.

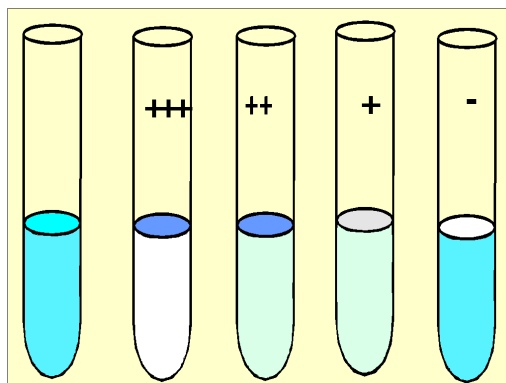


Figura 6 - Estratificação dos resultados positivos (MOREIRA & MALLMANN, 2002).

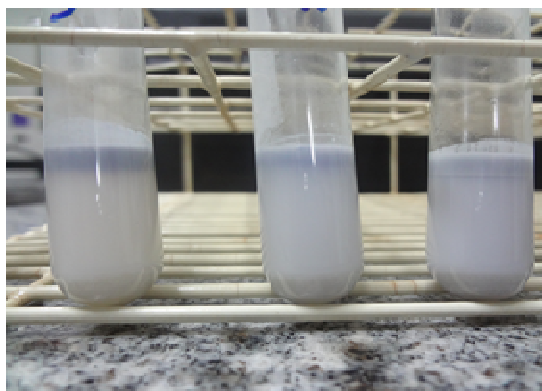


Figura 7 - Estratificação em 3 cruzeis; 2 cruzeis e 1 cruz (esquerda para direita).

O teste do anel em leite foi realizado de acordo com a técnica descrita por Garcia-Carrilo (1982) e modificado com base na metodologia descrita por Roepke & Stiles (1970).

Foram realizadas notificações às propriedades cujas amostras tiveram resultado positivo para a realização do teste AAT como teste individual de detecção de brucelose.

Na análise estatística, foi utilizado o *software* R (R Development CORE TEAM, 2010) e as médias de resultados para o TAL foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Para os resultados de grau de positividade da reação antígeno-anticorpo, foi realizado exato de Fischer (5%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de todos os exames de coletas, tanto de latões como de tanques, realizados com o TAL. Do total de 423 amostras de leite coletadas nos municípios de Unaí e Buritis, 73 delas (17,25%) tiveram resultados de reação positivos. As reações resultantes da utilização do TAL foram classificadas como negativas e positivas, conforme descrito na Figura 8.

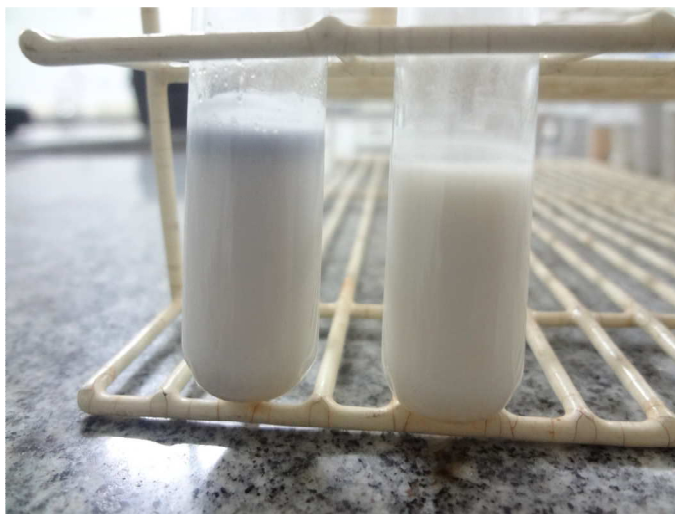


Figura 8 - Amostra positiva (esquerda) e amostra negativa (direita).

O resultado de 17,25% obtido neste estudo foi similar ao encontrado por Souza et al. (1996), de 12,5%, no município de Guaratinguetá, São Paulo. Em Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Poester & Gonçalves (2002) examinaram 394 amostras de leite

in natura recolhidas diretamente dos veículos transportadores, no momento em que o produto era distribuído à população e encontraram 9,4% de amostras entre positivas e suspeitas, no entanto, não realizaram exames sorológicos complementares.

No município de Unaí, um total de 16,96% indicou reações positivas e, no município de Buritis, 17,25% das amostras tiveram reações positivas (Tabela 1). Não houve diferença entre as duas regiões ($P>0,05$), apesar da disparidade como são tratados os municípios na política de prevenção.

Tabela 1 - Análise comparativa dos resultados das amostras das diferentes regiões

Número de propriedades	Positivas (f)	Positivas (%)	Negativas (f)	Negativas (%)	Total (f)
Unaí	57	16,96	279	83,04	336
Buritis	16	17,25	71	82,75	87
Valor de P	-	0,340	-	0,358	-
Total	73	-	350	-	423

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t.

A porcentagem de amostras positivas na região noroeste de Minas Gerais foi maior que a média descrita para o restante do País (BRASIL, 2005), de 4% para a Região Sul; 7,5%, Região Sudeste; 6,8%, Região Centro- Oeste; 2,5%, Região Nordeste; e 4,1% na Região Norte.

Na Tabela 2 destaca-se a região do Funil, que apresentou maior concentração de amostras positivas, 38,64 % ($P<0,05$), em relação à do Pico (16,30%) e aos diferentes pontos de coleta dentro do município (12,50%).

Tabela 2 - Análise comparativa dos resultados de amostras de diferentes regiões de Unaí, Minas Gerais

Número de propriedades	Positivas (f)	Positivas (%)	Negativas (f)	Negativas (%)
Pico	17	16,30b	77	83,70a
Funil	17	38,64a	27	61,36b
Demais regiões	25	12,5b	175	87,5a
Valor de P	-	0,021	-	0,03

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t.

Utilizando-se o isolamento da bactéria como teste padrão-ouro, o TAL apresenta especificidade de 87% e pode ter resultados falsos-positivos, encontrados em decorrência da presença de anticorpos vacinais, de leucócitos e de células de descamação da glândula mamária, encontrados normalmente em leite proveniente de animais com mastite ou colostro. Essas reações falsos-positivas podem estar associadas à presença de IgM, já que esta imunoglobulina, ao lado da IgA, é responsável pela reação do TAL (DASSO, 2006).

É possível também que tenha ocorrido alguma variação de falsos-positivos por influência de acidificação, ou até mesmo de amostras coletadas de latão com pouco leite e de poucas vacas, que se tornam quase amostras individuais. Baixa especificidade do TAL em amostras individuais de leite foi também descrita por Olascoaga (1976) e Heck et al. (1980), que consideraram que, em função da baixa especificidade do teste individual, os animais positivos ao TAL deveriam ser reavaliados em outras provas sorológicas.

Na Tabela 3 constam as correlações entre amostras positivas em relação aos diferentes níveis de produção de leite. As amostras do nível de produção até 300 L foram as que apresentaram maior positividade: 36 amostras positivas de um total de 48 amostras positivas.

Tabela 3 - Correlações entre amostras positivas e os níveis de produção de leite

Regiões	Total de amostras	Amostras positivas	Amostras positivas em relação à produção de leite		
			0 – 300 L	301 – 500 L	501 – 3000 L
	N	N	N	N	N
Pico	92	15	10	3	2
Funil	44	17	17	0	0
Buritis	87	16	9	4	3
Total	223	48	36	7	5

Na Tabela 4, no entanto, observa-se maior índice de positividade na região do Funil, cujas 17 amostras positivas foram coletadas de latão, uma vez que toda a região é formada por pequenos produtores de leite e armazenamento do leite em tanque comunitário.

Tabela 4 - Correlações entre o percentual de amostras positivas e a forma de armazenamento do leite: latão ou tanque de expansão

Regiões	Total de amostras	Amostras positivas	Positivos no latão	Positivos no tanque
	N	N	N	N
Pico	92	15	2	13
Funil	44	17	17	0
Buritís	87	16	8	8
Total	223	48	27	21

Na Figura 9 estão apresentadas as porcentagens de estratificação da intensidade de coagulação antígeno-anticorpo (uma, duas ou três cruzeiras). Considerando os dados demonstrados nessa figura, pode-se inferir algumas causas para as variações da intensidade da formação do anel no leite, pois, de acordo com Moreira & Mallmann (2002), o complexo antígeno-anticorpo adere-se à superfície dos glóbulos de gordura e sobe com eles, formando um anel de creme colorido, de intensidade variável, segundo o grau de reação, com descoloramento parcial ou total da coluna de leite. O número de vacas positivas, assim como o volume de leite produzido por vaca infectada e o volume total do tanque ou do latão, são fatores que interferem na intensidade da coagulação do anel do leite.

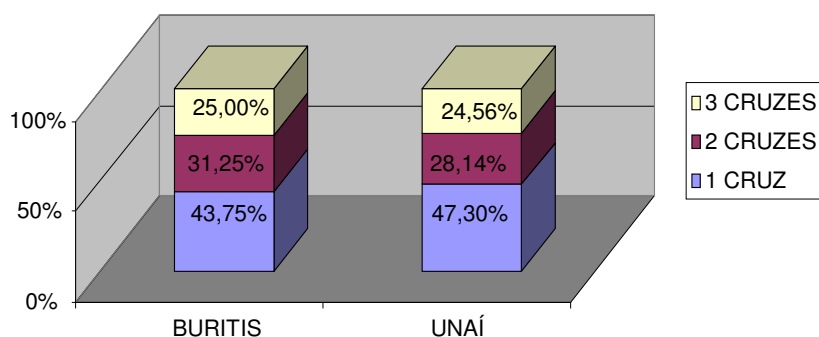


Figura 9 - Estratificação da intensidade de coagulação antígeno - anticorpo.

Na Tabela 5 é possível observar que não houve diferença ($P > 0,05$) para a intensidade da reação antígeno-anticorpo nos municípios de Unaí e Buritís.

Tabela 5 - Resultados positivos de acordo com a intensidade da reação antígeno-anticorpo estratificados em cruces (3 cruces: +++; 2 cruces: ++; 1 cruz: +) conforme a intensidade da coagulação do anel no leite

Diagnóstico (%)	Municípios analisados		Valor P
	Unaí	Buritis	
3 cruces	25,00	24,56	0,8946
2 cruces	31,25	28,14	0,1342
1 cruz	43,75	47,30	0,6742

* Médias seguidas de letras diferentes na linha são estatisticamente diferentes pelo Exato de Fisher (P<0,05).

6 CONCLUSÕES

O teste do anel em leite foi relevante para a formatação de um panorama de regiões dos municípios de Unaí e Buritis, pois confirmou-se como um teste de triagem, demonstrando quais localidades de coleta de leite carecem de intensificação de programas de prevenções via vacinação, assim como de erradicação dos indivíduos contaminados, por meio de identificação pelo teste antígeno acidificado tamponado (AAT) e dos testes confirmatórios.

A região noroeste de Minas Gerais apresenta positividade para o teste do anel em leite mais elevada que as médias das regiões brasileiras, inclusive a Região Sudeste.

A pouca produção de leite e o armazenado do leite em latões tem maior correlação com a positividade do teste do anel em leite, destacando assim as regiões e o perfil das propriedades em que devem ser intensificados os trabalhos de prevenção via vacinação, assim como de erradicação dos indivíduos contaminados.

A estratificação de acordo com a intensidade de coagulação antígeno anticorpo em três cruzes gera maior confiança no trabalho de rastreamento de propriedades positivas no teste do anel em leite, uma vez que reduz a presença de resultados falsos-positivos.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. R.; CHEVILLE, N. F.; DEYOE, B. L. Bovine ideal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of Brucella abortus strain. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 3, p. 28-35, 1988.
- ALMEIDA, T. M. P. **Brucelose A Última Década no Centro Hospitalar da Cova da Beira, E.P.E.** 90 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2009.
- ALVES, A. J. S.; VILLAR, K. S. Brucelose Bovina e sua situação sanitária no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 2, p. 12-17, 2011.
- BANDEIRA, K. **Brucelose Bovina**. Especialista em Produção de Leite. 2011. 23 f. Monografia (Especialista em Produção de Leite) – Universidade Tuiuti do Paraná. Cascavel-PR, 2011.
- BEVILACQUA, M. R. **Brucelose em Bovinos**. Especialização em defesa e vigilância sanitária animal em produção de leite. 2011. 28 f. Monografia (Especialização em Defesa e Vigilância Sanitária Animal) – Universidade Castelo Branco, Campo Grande-RN, 2008.
- BEZERRA, D. F. M. **Situação epidemiológica de brucelose bovina no Estado de Roraima**. 2011. 61 f. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-RO, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Defesa Sanitária Animal. Decreto nº 2 de 16 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006.

CASTRO, L. S. S. **Desenvolvimento de soros controle (IgG e IgM) para diagnóstico sorológico da brucelose bovina** 46 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2010.

CHAPPEL, R. J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. **Surveillance**, v. 16, n. 2, p. 3-6, 1989.

CHIELLE, L. L.; WEIBLEN, R.; MOREIRA, W. S.; FLORES, M. L. Especificidade da prova do anel em leite para diagnóstico da brucelose bovina na bacia leiteira do Município de Santa Maria – RS, Brasil. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 4, p. 351-358, 1989.

DASSO, M. G. **Brucelose bovina em rebanhos leiteiros do Rio grande do Sul**. 92 f. Dissertação (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DETILLEUX, P. G.; DEYOE, B. L.; CHEVILLE, N. F. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 7, p. 2320-2328, 1990.

DIVE/SES/SC Diretoria de Vigilância Epidemiológica Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. **Protocolo Estadual de Vigilância e Manejo Clínico de Brucelose Humana**. 2012. 29 p.

FERNANDES, M. O. L. **Brucelose dos pequenos ruminantes: estudo de focos na área administrativa da divisão de intervenção veterinária de Vila Real**. Mestrado (Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2012.

FRAZER, C. M. **Manual Merck de Veterinária**: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7.ed. São Paulo: Roca, 1996.

GARCIA-CARRILLO, C. Pruebas suplementarias para el diagnostico de la brucelosis. **Nota Técnica do Centro Panamericano de Zoonosis**, n. 25, p. 5-19, 1982.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Departamento de Microbiologia**, v. 90, n. 1-4, p. 281-297, 2002.

HECK, F. C.; WILLIAMS, J. D.; PRUETT, J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, p. 2082-2084, 1980.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 191-195, 2003.

- HUBER, D. J.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 7, p. 529-1531, 1986.
- JONES, S. M.; WINTER, A. J. Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 3011-3014, 1992.
- KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, n. 1, p. 65-78, 2003.
- LOPES, B. B.; ZAPPA, V. Brucelose Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – ISSN: 1679-7353 ed. FAEF, 2013.
- MAQUART, M. et al. MLVA - 16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/145>>. Acesso em: 3 jun. 2011.
- MONTEIRO, L. A. R. C.; PELLEGRIN, A. O.; ISHIKAWA, M. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 217-222, 2006.
- MOREIRA, W. S.; MALLMANN, C. A. **Brucelose humana e animal - epidemiologia, clínica, profilaxia, legislação e diagnóstico**, v. 3, p. 40, 2002.
- NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 22, p. 183-201, 2001.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – OIE. **Código Zoosanitário Internacional**. Novena Edición. Paris, França, 2000.
- OLASCOAGA, C. R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v. 18, p. 107-141, 1976.
- OLINTO, F. A. **Estudo retrospectivo da brucelose bovina na microrregião de Paudos Ferros, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil**. 40 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, 2010.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIES. **Código Zoosanitário Internacional, Enfermidades dos Bovinos da lista B, recomendações aplicáveis à enfermidades específicas**. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2006.
- PAULIN, M. L.; FERREIRA, J. S. N. **O combate á brucelose bovina, situação brasileira**. Jaboticabal: Ed. Funep, 2003. p. 21-29.
- PIZARRO-CERDÁ J.; MORENO E, SANGUEDOLCE V, MEGE JL, GORVEL JP. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-compartments. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2387-2392, 1998.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, supl. 1, p. 1-5, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010). R: **A language and environment for statistical computing**. [online]. R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. 2156 p.

RIBEIRO, M.; MOTTA, R.; ALMEIDA, C. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 83-92, 2008.

ROEPKE, M. H.; STILES J. R.; F. C. Potential efficiency of milk ring test for detection of brucellosis. **American Journal Veterinary Research**, v. 31, p. 2145-2149, 1970.

SANTOS, R. L.; LAGE, P. A.; BORGES, A. M.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, F. L. Brucelose Bovina. **Caderno técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 47, p. 1, 2005.

SILVA JR., F. F.; MEGIDII, J.; NOZAKII, C. N.; PINTOII, J. P. A. N. Evaluation of the ring test in an epidemiological surveillance of bovine brucellosis in herds and dairies. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 295-300, 2007.

SOUZA, L. A.; VIANA, R. C. A.; MICHALICK, M. S. M.; REIS, J. K. P.; LAGE, A. P. Prevalência da infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte – MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 127-131, 1996.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718 p.

ZOGHI, E.; EBADI, A.; MOHSENI, B. Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. **Archives of RAZI Institute**, v. 42/43, p. 35-38, 1992.

ANEXO 1

Cálculo para delimitação da amostra de pesquisa no laticínio A

n = tamanho da amostra.

σ = nível de confiança (escolhido em número de desvios-sigmas, em que sigma é igual a 1).

p = proporção da característica pesquisada, calculada em porcentagem.

q = 100 – p (em porcentagem).

N = tamanho da população.

E2 = erro de estimação permitido (5%).

Admite-se que p = 50 (proporcionalidade desconhecida). Se p = 50, conclui-se que q = 50.

$$\begin{aligned}n &= (\sigma^2 (p.q.N)) / (E^2 (N-1) + \sigma^2 (p.q)) \\n &= (1^2 (50.50.200)) / (5^2 (200-1) + 1^2.(50.50)) \\n &= 500.000 / (25 (199) + 2.500) \\n &= 500.000 / (4975 + 2500) \\n &= 500.000 / 7475\end{aligned}$$

$$\mathbf{n=66}$$

Cálculo para delimitação da amostra de pesquisa no laticínio B.

n = tamanho da amostra.

σ = nível de confiança (escolhido em número de desvios- sigmas, em que sigma é igual a 1).

p = proporção da característica pesquisada, calculada em porcentagem.

q = 100 – p (em porcentagem).

N = tamanho da população.

E2 = erro de estimação permitido (5%).

Admite-se que p = 50 (proporcionalidade desconhecida). Se p = 50 conclui-se que q = 50.

$$\begin{aligned}n &= (\sigma^2 (p.q.N)) / (E^2 (N-1) + \sigma^2 (p.q)) \\n &= (1^2 (50.50.1500)) / (5^2 (1.500-1) + 1^2.(50.50)) \\n &= 3.750.000 / (25(1.499) + 2.500) \\n &= 3.750.000 / (37.475 + 2.500) \\n &= 3.750.000 / 39.975\end{aligned}$$

$$\mathbf{n=93}$$