

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À  
BRUCELOSE BOVINA EM REBANHOS DE MATO  
GROSSO DO SUL**

**Letícia Almeida Retumba Carneiro Monteiro**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL  
SETEMBRO DE 2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À  
BRUCELOSE BOVINA EM REBANHOS DE MATO  
GROSSO DO SUL**

**Letícia Almeida Retumba Carneiro Monteiro**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Mato  
Grosso do Sul como requisito à  
obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal. Área de  
concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL  
2004

*Na esperança que não morre,  
Nas metas que se desviam,  
No desânimo dos que fracassam,  
Na perseverança dos que vencem,  
Ou na dos que persistem apesar de fracassados,  
Nas vitórias proclamadas,  
Nas derrotas disfarçadas,  
Nos sonhos que se realizam,  
E naqueles que apenas são sonhados,  
Nas pedras ou nas flores do caminho,  
Nas retas ou desvios,  
Nas lágrimas do que se perde,  
Na alegria do que se conquista,  
No que se diversifica, porque somos diferentes,  
Ou no que se assemelha, apesar de sermos diferentes...  
De tudo aquilo que vemos ou ouvimos, com o coração e a mente  
atentos...  
Se tira uma lição de vida.*

Autor desconhecido

Aos meus pais Léla e Ferrúcio

Aos meus irmãos Osório, Eudóro, Heitor,

Florianano, Alexandre, Lúcia, Lucy,

Humberto e Augusto

Aos meus filhos queridos

Gabriela e Vinícius, razão de tudo

À cunhada Adriana e sobrinhos

Otávio e Mariana

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e à Nossa Senhora, por iluminarem meu caminho e minhas decisões

Aos meus pais, Léla e Ferrúcio, pela educação, amor e incentivo

Aos meus filhos, Gabriela e Vinícius, que souberam compreender minhas ausências, com amor e companheirismo, sempre prontos a ajudar, especialmente na informática

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Luíza Alves Rosa Osório, pela amizade, por seu exemplo, pelos ensinamentos e dedicação e por confiar em mim

À Professora Doutora Maria da Graça Moraes, Coordenadora do Programa Mestrado em Ciência Animal na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade

Aos Professores Doutores Aiesca Oliveira Pellegrin, Márcia Mayumi Ishikawa e Michael Robin Honer, pela co-orientação

A todos os professores, pelos ensinamentos e amizade

Aos colegas, pela amizade e companheirismo

Ao colega Luiz Antônio Silva Melo, pelo convite a auxiliá-lo em uma cesariana, quando experimentei a Medicina Veterinária, decidindo-me em abraçá-la como profissão

À Marilete Otaño Peixoto Ferencz, secretária do Programa Mestrado em Ciência Animal, pela dedicação e boa vontade

Ao colega Alexandre Auler Krabbe, diretor-presidente da IAGRO, por possibilitar minha participação no Curso e acreditar no meu ideal

A todos os colegas e funcionários do LADDAN, pelo incentivo, apoio e amizade

Aos colegas Ilda Francisca Neves Bottene, Osvaldo Pereira Dias, Afonso Dutra de Oliveira, Honorato Siqueira Campos, Tereza Suyako Kakasu e inspetores dos escritórios locais da IAGRO, pela colaboração na agilização dos trabalhos de campo

Aos auxiliares Pedro Jesus Vicente Ferreira e Carlos Alberto Cáceres, incansáveis na colheita das amostras, mesmo quando o sol castigava nos mangueiros

Aos fazendeiros, pela confiança e auxílio nos trabalhos de campo

Aos animais que serviram ao desenvolvimento deste estudo

Aos amigos Aline de Oliveira Figueiredo, Débora Ribeiro de Toledo, Viviane Muller Dantas e ao Marcus Osório da Silva, que auxiliaram no armazenamento dos dados no Microsoft Access

Aos amigos Professor Antônio Osório, Raquel e Filipe, pela grande amizade e por saberem dividir comigo os momentos com a Doutora Ana Luíza

*Muito obrigada.*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Conceituação e histórico.....	1
1.2 Etiologia.....	2
1.3 Epidemiologia .....	4
1.3.1 Distribuição, prevalência e impacto econômico.....	4
1.3.2 Hospedeiros e reservatórios .....	6
1.3.3 Transmissão .....	7
1.3.4 Fatores de risco para transmissão inter e intra-rebanhos .....	9
1.4 Brucelose zoonótica .....	10
1.5 Patogenia e sinais clínicos .....	11
1.6 Resposta imunológica .....	12
1.7 Diagnóstico.....	14
1.7.1 Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo .....	17
1.7.2 Diagnóstico diferencial.....	19
1.8 Controle.....	19
1.8.1 Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose bovina — PNCEBT.....	21

## ARTIGO

	INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BRUCELOSE BOVINA EM UM ESTRATO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....	23
1	Introdução .....	25
2	Materiais e métodos.....	27
2.1	Amostragem .....	27
2.1.1	Área de estudo.....	27
2.1.2	Métodos de amostragem.....	27
2.1.3	Obtenção das amostras.....	29
2.2	Testes diagnósticos.....	29
2.3	Questionário.....	30
2.4	Banco de dados.....	30
2.5	Análise estatística.....	31
2.5.1	Prevalência de animais infectados.....	31
2.5.2	Prevalência de rebanhos infectados.....	31
2.5.3	Estimativa da sensibilidade e especificidade de rebanho.....	32
2.5.4	Valores preditivos.....	33
2.6	Análise dos fatores de risco.....	33
3	Resultados.....	33
4	Discussão.....	37
5	Conclusão.....	39
6	Referências.....	40
2	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	43
3	REFERÊNCIAS .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rebanhos e animais amostrados, por município, do estrato estudado .....	29
Tabela 2	Resultado do teste confirmatório, após triagem, em animais, por município ....	34
Tabela 3	Classificação dos rebanhos, segundo o teste confirmatório 2-ME em propriedades amostradas, por município.....	35
Tabela 4	Prevalências aparente e real obtidas a partir do diagnóstico confirmatório, nos 2.376 animais amostrados.....	35
Tabela 5	Prevalências aparente e real obtidas a partir da classificação das propriedades amostradas .....	36
Tabela 6	Prevalência aparente, prevalência real e valores preditivos das propriedades pesquisadas .....	36
Tabela 7	Fatores de risco componentes da brucelose nos rebanhos estudados, com os respectivos valores das <i>odds ratio</i> (OR) .....	36



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Conceituação e histórico

A brucelose é uma zoonose de evolução geralmente crônica, causada por bactéria intracelular facultativa do gênero *Brucella*. Nos animais é uma enfermidade dos sistemas reprodutivo e osteoarticular, ocasionando aborto no terço final da gestação, orquite e epididimite nos touros e, no homem, infecção generalizada. Nos bovinos é descrita como doença de Bang, mal de Bang, aborto enzoótico ou aborto infeccioso dos bovinos e, nos humanos, é conhecida também como febre ondulante, febre de Malta ou febre do Mediterrâneo (Metcalf et al. 1994, Paulin & Ferreira Neto 2003).

É classificada como doença da lista B pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE), que reúne as doenças transmissíveis consideradas de importância socioeconômica e/ou para a saúde pública e com consequências no comércio internacional de animais e seus produtos (Paulin & Ferreira Neto 2003, Campaña et al. 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), OIE e Organização de Alimentos e de Agricultura das Nações Unidas (FAO), a brucelose é uma das zoonoses mais importantes e difundidas no mundo (Poester et al. 2002).

As primeiras pesquisas sobre a brucelose foram feitas por Marston, em 1859, quando contraiu a enfermidade na ilha de Malta. Outros estudos descreveram como uma doença crônica debilitante com complicações de reumatismo em marinheiros durante a guerra da Criméia e, mais tarde em Malta, David Bruce isolou de baço humano *Micrococcus melitensis*. Em estudos posteriores, o médico Themistocles Zammit e sua equipe encontraram aglutininas em sangue de cabras e isolaram a bactéria de sangue e leite dessa espécie animal. Em 1879, Wright e Smith desenvolveram o teste de soroaglutinação lenta em tubo (SAL) para o diagnóstico da brucelose. O primeiro isolamento de brucela em bovinos foi em 1887, na Dinamarca, por Stribolt e Bang, que denominaram de *Bacillus abortus bovis* e relacionaram com o aborto infeccioso bovino. Mais tarde, em 1895, o veterinário patologista e bacteriologista L.F. Benhard Bang, descreveu o agente causador de brucelose no gado e o chamou de *Bacillus abortus*. Em 1914, nos Estados Unidos, foi isolada *Brucella* de um feto suíno abortado e a denominaram de *Brucella suis* (Nicoletti 2002). Em ovinos, a brucelose foi registrada em 1906 por Garcia Izcara e o primeiro caso em humanos foi identificado nos EUA, em 1918, por Alice Evans (Paulin & Ferreira Neto 2003). Dois anos mais tarde, Mayer e

Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* e, em 1923, Huddleson classificou as três espécies nesse gênero: *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*. Em 1929, esse pesquisador desenvolveu o teste de soroaglutinação rápida em placa (SAR). Os experimentos com a primeira vacina, a B19, iniciaram em 1923, quando John Buck isolou *B. abortus* do leite de uma vaca da raça Jersey, que se tornara estéril. A mutação espontânea dessa amostra foi estudada por cerca de trinta anos e observada sua estabilidade e imunidade prolongada (Paulin & Ferreira Neto 2003). Em 1930, a denominação de doença de Bang substituiu a conhecida doença aborto infeccioso bovino (Nicoletti 2002).

No Brasil, a brucelose foi detectada pela primeira vez em 1913, por Gonçalves e Carneiro, descrevendo um caso humano (Poester et al. 2002). Em bovinos, o primeiro diagnóstico clínico da doença foi realizado por Danton Seixas, em 1914. No município de São Carlos, São Paulo, em 1922, Tinaciro Icibaci descreveu um foco de brucelose bovina examinando tecidos de fetos abortados. Em 1928, Mello e Neiva isolaram *B. abortus* de uma vaca que abortara. No ano de 1933, em um lote de 51 bovinos, Sílvia Torres detectou brucelose em 8 animais e diagnosticou 19 suspeitos. Outro pesquisador, Desidério Finamor, detectou a enfermidade, em 1936, no Rio Grande do Sul e Thiago de Mello, em 1950, relatou a prevalência de 10% a 20% da brucelose no país (OIE 1987, Paulin & Ferreira Neto 2002).

## 1.2 Etiologia

Bactéria intracelular facultativa (*B. abortus*) pertencente ao gênero *Brucella* que comporta outras seis espécies morfológicamente indistinguíveis, associadas a diferentes hospedeiros, *Brucella suis* (suínos), *Brucella melitensis* (ovinos e caprinos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (caninos), *Brucella neotomae* (rato de deserto) e a mais recente, isolada de mamíferos marinhos (focas, leões marinhos, golfinhos e baleias), *Brucella maris*, cuja denominação ainda não oficial do grupo, possui dois tipos de cepas, uma proveniente de cetáceos e outra originada de focas. A distinção das seis espécies é realizada por provas bioquímicas e sorológicas (López-Merino 2004).

Segundo o Subcomitê Taxonômico da FAO, *B. abortus* possui oito biotipos diferentes quanto à patogenicidade e virulência, sendo igualmente importantes em estudos de epidemiologia molecular. São bacilos curtos, medindo 0,5-0,7 mm x 0,6-1,55 mm, encontrados isolados e raramente formando cadeias curtas, não formam cápsula nem

esporos, imóveis, gram-negativos, pleomórficos, crescem em condições microaerófilas (Campaña et al. 2003).

As bactérias do gênero *Brucella* se reúnem em dois grupos antigenicamente distintos: brucelas lisas ou clássicas: *Brucella abortus*, 8 biotipos; *Brucella suis*, 5 biotipos; *Brucella melitensis*, 3 biotipos; e brucelas rugosas: *Brucella ovis*, *Brucella canis* e *Brucella neotomae*, que embora apresentem variantes não se subdividem em biotipos (Metcalf et al. 1994, Acha & Szyfres 1986). A classificação em biotipos ou tipos diferenciados bioquimicamente ocorre em função das necessidades de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S, crescimento em presença de fucsina ou tionina e aglutinação frente aos soros monoespecíficos (Molnár et al. 1997).

No Brasil são poucos os estudos sobre a identificação dos biotipos de *Brucella* isoladas de bovídeos. Foram isoladas *B. abortus* biotipos 1, 2 e 3 e *B. suis* biotipo 1. Além dessas espécies, também já foram identificadas no Brasil, infectando animais domésticos, *B. canis* e *B. ovis*. O principal agente etiológico da brucelose caprina, *B. melitensis*, ainda não foi identificado no Brasil (Brasil 2003).

As bactérias do gênero *Brucella*, apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam nele; elas são medianamente sensíveis aos fatores ambientais. Entretanto, a resistência diminui quando aumentam a temperatura e a luz solar direta ou diminui a umidade. As brucelas resistem às condições do meio ambiente desde que protegidas por matéria orgânica, como restos placentários, produtos de aborto, fezes, leite e manteiga. Em esterqueira são rapidamente destruídas pela acidez (OMS 1986, Brasil 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

Podem ser eliminadas no máximo em quinze minutos pela ação dos desinfetantes comuns, como produtos clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeído a 2% em temperatura ambiente superior a 15°C, compostos fenólicos a 2,5% e permanganato de potássio (1:5000). Álcool a 70% destrói prontamente as bactérias, e carbonato de cálcio (1:10), em trinta minutos. Como a matéria orgânica, composta de produtos de aborto, restos placentários, leite, manteiga, fezes, reduz a eficácia da maior parte dos desinfetantes, recomenda-se sua remoção antes da aplicação dos produtos (OMS 1986, Paulin & Ferreira Neto 2003). Tais desinfetantes disponíveis no mercado destroem as brucelas, desde que utilizados corretamente na diluição recomendada e tempo de ação preconizado.

As bactérias do gênero *Brucella* são exigentes, para o isolamento necessitam de atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub>, e as cepas apresentam bom crescimento em ágar-sangue e em outros meios seletivos, como os enriquecidos com antibióticos, clorhexidina e etilvioleta. Em alguns casos é feita a inoculação em cobaia, coelho ou camundongo. O isolamento e a identificação do agente são métodos mais seguros de diagnóstico, porém demorados, concluindo-se em aproximadamente duas semanas, além de ser perigoso por ser responsável pela brucelose zoonótica e, assim, exige condições de biossegurança (Molnár et al. 1997).

### **1.3 Epidemiologia**

#### **1.3.1 Distribuição, prevalência e impacto econômico**

A brucelose por *B. abortus* apresenta distribuição universal, com exceção do Japão, Canadá, Austrália e de vários países europeus onde foi erradicada, com a adoção de medidas iniciadas há mais de vinte anos. Alguns países mantêm a brucelose controlada e com diminuição de sua incidência, como é o caso da França e dos Estados Unidos da América (Molnár et al. 2000) e apresenta-se mais concentrada nos países em desenvolvimento da África, da América do Sul, do Oriente Médio e da Ásia (Paulin & Ferreira Neto 2003). No Brasil, ela é endêmica e as perdas econômicas são causadas por abortos, redução de 15% na produção de bezerros, aumento do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, diminuição de 25% na produção de carne e leite, e por complicações reprodutivas, com períodos de esterilidade temporária ou infertilidade, além da desvalorização comercial das propriedades e seus animais considerados infectados (Brasil 2003).

No Brasil, o Ministério da Agricultura (MA), em 1971, estimou as perdas anuais decorrentes de abortos e perdas na produção leiteira, causados pela brucelose em US\$ 32 milhões (Poester et al. 2002, Paulin & Ferreira Neto 2003). Em outros países, essas perdas econômicas nos rebanhos bovinos são estimadas em US\$ 23.5 milhões, no Paraguai (Baumgarten 2002); chegam a US\$ 60 milhões, na Argentina, segundo dados do Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Samartino 2002) e a US\$ 25 milhões nos países que compõem a América Central (Moreno 2002). No México, segundo a Comissão Nacional para a Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina (CONETB), esses valores alcançam US\$ 200 milhões ao ano. O custo de cada aborto causado por brucelose é estimado em aproximadamente US\$ 1.000 a US\$ 2.000 e,

assim como nos demais países, constitui o principal impacto da doença nos rebanhos bovinos (Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002).

Em 1975, o MA realizou um inquérito sorológico na maioria das unidades federativas, que revelou a estimativa de porcentagem de animais reatores em 4% na região Sul, 7,5% na Sudeste, 6,8% na Centro-Oeste, 2,5% na Nordeste e 4,1% na Norte (Poester et al. 2002, Brasil 2003). Esses registros, quando analisados com os obtidos em estudos posteriores, por iniciativas isoladas de alguns Estados, permitem afirmar que a doença está presente em todo o país, embora existam diferenças entre regiões e entre Estados (Paulin & Ferreira Neto 2003).

Após um programa de vacinação bem conduzido no Estado do Rio Grande do Sul, a prevalência da doença diminuiu de 2% em 1975 para 0,3% em 1986, enquanto o Estado de Santa Catarina apresentou aumento de 0,2% em 1975 para 0,6% em 1996, e em Minas Gerais, a prevalência, que era de 7,65% em 1975, diminuiu para 6,7% em 1980 (Paulin & Ferreira Neto 2002).

Por causa da importância econômica e da saúde pública da brucelose, em 1980, o Governo do Estado de Minas Gerais avaliou a situação da enfermidade e decidiu iniciar, no ano seguinte, uma campanha de vacinação voluntária, de bezerras de três a oito meses, que em 1994 se tornou obrigatória (Paulin & Ferreira Neto 2002).

No ano de 2003, o Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA), ao realizar o estudo soropidemiológico da brucelose em 13.536 animais provenientes de 1.118 propriedades, encontrou prevalência em rebanho de 41,19% e 10,25% em animais (INDEA 2004).

A situação da brucelose em Mato Grosso do Sul não é diferente da que ocorre em outros Estados brasileiros. Os dados de 1975 apontam uma prevalência de 1% a 3,9%, segundo o levantamento sorológico realizado na região de planície do então Estado de Mato Grosso pelo Programa Nacional de Sanidade Animal (PRONASA). Entre 1981 e 1984, o Departamento de Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul (IAGRO), atual Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), colheu 326.316 amostras de bovinos em todo MS e os resultados do teste SAR foram 10.939 sororreagentes (3,35%) (Cavalléro 1998).

Recentemente, Almeida (2001), ao examinar 989 soros de bovinos de MS, obteve 8,6% de soropositividade no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 9% no teste *Rapid Automated Presumptive (RAP)*.

No Pantanal Sul-Mato-Grossense, região com características peculiares de clima, topografia, hábitos e manejo do rebanho, onde se encontram aproximadamente 3,1 milhões de bovinos e a prática de vacinação é pontual (Pellegrin et al. 1999), Cavalléro (1998) relata que a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul realizou levantamento sorológico, encontrando 8,08% (206/2.276) de animais positivos pelo teste SAR e 10,19% (231/1.942) amostras positivas pelo teste do AAT. Na mesma região, Pellegrin et al. (1999), durante o período de 1995 a 1997, realizaram estudo em 26 fazendas e coletaram 495 amostras. Utilizando os testes do AAT e do 2-mercaptoetanol (2-ME), dez propriedades apresentaram animais sorologicamente positivos para brucelose, sendo a prevalência global de 3,43% (Intervalo de confiança (IC) 95%: 1,40-5,47).

Entre os animais silvestres, Ito et al. (1998), pesquisando leptospirose e brucelose em queixada (*Tayassu pecari*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e cateto (*Tayassu tajacu*) na região de Corumbá, Mato Grosso do Sul, detectaram soropositividade para brucelose, pelos testes de rosa bengala e SAR, com títulos de 1:100, em 2 (n=7) queixadas, 1 (n=3) capivaras, e nenhum cateto, de um total de 3, reagiu aos testes. Nos EUA e Canadá, *B. abortus* foi isolada da placenta de veados (*Odocoileus virginianus* e *O. bemonus*) e alces (*Alces alces*) (Bishop et al. 1994).

### **1.3.2 Hospedeiros e reservatórios**

Os bovinos são os principais hospedeiros naturais de *B. abortus*, e a doença se manifesta ao atingirem a maturidade sexual e em criações mais intensivas (gado de corte confinado e gado de leite). Animais imaturos sexualmente podem infectar-se transitoriamente, ao ingerirem a bactéria, e apenas eliminá-la pelas fezes; portanto, não se caracterizam como fontes de infecção (Paulin & Ferreira Neto 2003, Acha & Szyfres 1986).

Além dos bovinos, outros animais domésticos podem se infectar por *B. abortus*, entre eles, os bubalinos, suínos, ovinos, caprinos e cães, e os eqüídeos são, geralmente, terminais na cadeia de transmissão. Em ovinos e caprinos, a infecção é, com frequência, ocasional (Blaha 1995, Paulin & Ferreira Neto 2003).

No Brasil, os baguás (*Bos taurus indicus*) — animais domésticos vivendo em condições silvestres —, capivaras, queixadas e catetos são estudados na transmissão da brucelose durante as cheias, quando animais silvestres e domésticos procuram locais mais altos, e, nessas condições, podem infectar-se ingerindo subprodutos de abortamento de vacas brucélicas (Ito et al. 1998, Paulin & Ferreira Neto 2003).

A suscetibilidade dos hospedeiros à infecção por *B. abortus* está mais relacionada com a maturidade sexual do que com a idade dos animais, e as fêmeas são mais suscetíveis que os machos (Crawford et al. 1990). Poester et al. (2002) consideram válido ressaltar que, no Brasil, a brucelose bovina é altamente prevalente em rebanhos de corte, o que coincide com Campero et al. (2003), que ao estudarem, na Argentina, fetos abortados, provenientes dos dois sistemas de exploração, isolaram o agente, principalmente nos rebanhos de corte. No Brasil, os rebanhos são constituídos, principalmente, por raças zebuínas, com exceção da região Sul, onde são mais comuns as raças européias e cruzamentos dessas com o zebu (Poester et al. 2002).

O homem é suscetível, especialmente os que lidam de forma direta com os animais ou trabalham em frigoríficos ou laboratório e ainda aqueles que costumam ingerir leite e subprodutos do leite sem tratamento térmico (Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002, Brasil 2003, López-Merino 2004).

### **1.3.3 Transmissão**

A via de entrada mais freqüente das brucelas é a oral, por meio de água e alimentos contaminados. Essa porta de entrada é importante para um bovino suscetível quando se infecta por meio de material fecal de bezerros que tenham se alimentado de leite contaminado (OMS 1986, Brasil 2003). Um bovino pode adquirir a doença apenas por cheirar fetos abortados, pois a bactéria pode penetrar pelas mucosas do nariz e dos olhos (Brasil 2003). Mucosas do trato genital e soluções de continuidade da pele também podem ser portas de entrada para a bactéria (Bishop et al. 1994). A infecção congênita que acarreta o fenômeno de latência tem sido bastante estudada no sentido de avaliar a real importância como porta de entrada (Acha & Szyfres 1986).

Para os bovinos, as fontes mais comuns de infecção são os fetos abortados, envoltórios fetais, as descargas vaginais de fêmeas infectadas e a água, alimentos e fômites contaminados. As vacas e novilhas brucélicas desempenham importante papel na

difusão da doença, tanto no parto quanto nos casos de aborto, quando lambem os bezerros recém-nascidos e infectados ou restos placentários e líquidos que contêm quantidade elevada de brucelas. Além disso, os bovinos podem vir a beber água e comer pastos, forragens, contaminados pelas membranas fetais, excreções vaginais, fezes e leite (Blaha 1995, Brautigam Rivera 1997, Campos et al. 2003).

Os touros parecem não ter importância marcante na transmissão da doença (Campero 1993). Enquanto a contaminação por touro brucélico em monta natural é estimada em torno de 2%, situação em que a fêmea estaria em parte protegida por ação das defesas naturais da vagina, na inseminação artificial, quando o sêmen é depositado diretamente no útero, é freqüente o doador infectado transmitir a brucelose (Acha & Szyfres 1986, Campos et al. 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

A transferência de embriões de doadoras infectadas para receptoras sadias é considerada de baixo risco, se todos os embriões destinados à micromanipulação forem lavados conforme recomendado pelo Código Zoosanitário Internacional da OIE e constante nos protocolos descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), de 1998, o qual preconiza a comprovação da integridade da membrana pelúcida antes e depois da lavagem, isenta de material aderido (Bishop et al. 1994, Paulin & Ferreira Neto 2003). Dessa forma, a transferência de embriões pode ser um caminho para recuperar o material genético de animais infectados (Cavalléro 1998, Radostits 2002, Brasil 2003).

Na maioria das vezes, a doença aparece pela introdução de animais doentes em rebanhos livres da enfermidade, nos quais os animais não apresentam imunidade contra a brucelose. No início ocorre um elevado número de casos de aborto, que é reduzido após aproximadamente dois anos, quando as fêmeas doentes não mais abortam, embora continuem portadoras e produzindo bezerros fracos e pouco desenvolvidos (Paulin & Ferreira Neto 2003, Acha & Szyfres 1986). Esses bezerros, filhos de vacas brucélicas ou quando alimentados com leite dessas fêmeas, podem ser portadores e responsáveis pela difusão da doença no ambiente e, ainda, albergar o agente nos linfonodos que drenam o trato gastrointestinal e excretar brucelas pelas fezes. Todavia, seis a oito semanas após a suspensão do alimento tornam-se livres, pois bezerros até seis meses de idade são pouco suscetíveis à infecção e geralmente infectam-se de forma transitória. Todavia, ao



atingirem a maturidade sexual podem se reinfectar (Acha & Szyfres 1986, OMS 1986, Paulin & Ferreira Neto 2003).

Além da transmissão da brucela pelo leite aos seus bezerros, vacas brucélicas podem infectar seus produtos no útero, durante ou logo após o parto. Nesse caso, a infecção torna-se latente (portador latente), as fêmeas apresentam sorologia negativa até atingirem a maturidade sexual. Essas fêmeas, em geral, abortam na primeira prenhez, e só apresentam resultados positivos para os testes sorológicos no decorrer da gestação (Ray et al. 1988, Ficht 2003). Esse fenômeno ocorre com frequência de 2,5% a 9% em condições naturais de campo; porém, apesar de não impedir o avanço dos programas de controle e erradicação, atrasa a eliminação do agente de uma população (Bishop et al. 1994, Brasil 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

#### **1.3.4 Fatores de risco para transmissão inter e intra-rebanhos**

Do ponto de vista prático, os fatores que influenciam a transmissão da brucelose em uma região podem ser classificados em duas categorias fundamentais: os associados com a doença entre rebanhos e os que influenciam a manutenção e disseminação da infecção dentro dos rebanhos (Crawford et al. 1990).

Dentre os fatores responsáveis pela transmissão entre rebanhos, os principais são: a) aquisição de animais infectados em rebanhos livres da doença, considerando-se a frequência dessa prática, a fonte de aquisição dos animais e o histórico dos testes de diagnóstico; b) proximidade a rebanhos infectados, que compartilham pastos, muitas vezes divididos por uma simples cerca; c) cursos d'água comuns parecem ter papel duvidoso na transmissão inter-rebanhos. Embora não deva ser desconsiderado, pois enquanto a água proporciona um ambiente favorável para a sobrevivência de *Brucella*, existe o fator diluição associado com o curso d'água, que a torna um modo improvável de transmissão entre rebanhos (Crawford et al. 1990); d) sombreamento, umidade e baixas temperaturas favorecem a sobrevivência do agente no ambiente, o que aumenta as chances de ele infectar um outro animal suscetível (Acha & Szyfres 1986, Paulin & Ferreira Neto 2003); e e) animais que se alimentam de outros em decomposição, assim como os pássaros são citados como possíveis meios pelos quais os materiais contaminados por *Brucella* são transmitidos entre rebanhos (Crawford et al. 1990).

Os principais fatores que influenciam a transmissão intra-rebanhos são: a) nível de vacinação do rebanho, que, segundo opinião de consenso, a vacina B19 confere relativa imunidade, com 65% a 75% de animais protegidos contra exposição sob condições de campo, resultando em redução no número de animais reagentes detectados em rebanhos infectados vacinados comparados a rebanhos infectados não vacinados. O benefício da vacinação é duplo: diminui a suscetibilidade do animal à infecção e a subsequente redução na prevalência dentro do rebanho diminui o nível de exposição por redução do número de animais excretando *Brucella*; b) tamanho do rebanho, mesmo sendo um conceito relativo, existem alguns aspectos associados com grandes rebanhos, os quais podem facilitar a transmissão da brucelose, como a aquisição ou reposição de animais, particularmente em rebanhos leiteiros, bem como as questões de logística e administrativas, e um terceiro aspecto é a possível influência do tamanho de rebanho na dinâmica da doença, assim, se a população doente aumenta, é provável que a transmissão da doença seja maior, como resultado de maior oportunidade de interações entre os setores infectado, suscetível e resistente da população; c) densidade populacional (animal/hectare), citada como um importante fator que influencia a transmissão e persistência da brucelose no rebanho e parece ser importante no que se refere a contato entre animais suscetíveis e infectados (Crawford et al. 1990). No Brasil, em levantamentos oficiais realizados nas diferentes regiões, a doença apresenta-se de forma endêmica e as maiores prevalências estão naquelas com maior densidade bovina (Poester et al. 2002); d) condições de instalações são determinantes na infecção por *Brucella* no que se refere à higiene e desinfecção de materiais; e e) uso de piquete maternidade tem reduzido o nível de infecção, por causa da diminuição de exposição de animais suscetíveis a materiais infectados (Crawford et al. 1990).

#### **1.4 Brucelose zoonótica**

Representa um grave problema de saúde pública, sobretudo pelo caráter ocupacional por causa da manipulação de carcaças contaminadas em matadouros e propriedades rurais por profissionais afins ou por ingestão de alimentos crus contaminados ou, ainda, por acidentes vacinais e laboratoriais. Acomete principalmente assistentes agropecuários, médicos-veterinários, tratadores, vaqueiros, laboratoristas e magarefes, por desenvolverem atividades que os expõem ao risco de infecção com maior frequência (Campaña et al. 2003, Alton & Forsyth 1996).

O contato com as mucosas, sobretudo a conjuntiva e a mucosa respiratória e soluções de continuidade da pele é importante em acidentes de vacinação de bovinos com vacina atenuada (atenuada apenas para fêmeas bovinas entre três e oito meses de idade), nas intervenções obstétricas em partos distócicos ou abortos, sem a proteção adequada (Brasil 2003, Campaña et al. 2003). Estudos epidemiológicos afirmam que a transmissão por aerossóis assumem importância em frigoríficos e laboratórios (Acha & Szyfres 1986).

É uma enfermidade septicêmica, que se inicia com sintomas semelhantes a uma gripe, com sinais de febre contínua, intermitente ou irregular, persiste por algumas semanas ou meses com agravamento do quadro. Na forma aguda, os sintomas são calafrios, suores noturnos intensos e temperatura elevada, que pode chegar a 40°C, fadiga, cefaléias, insônia, artralgias, dores generalizadas e impacto no sistema nervoso central, levando à neurastenia e depressão (Acha & Szyfres 1986, Almeida & Reis 1999). Podem ocorrer complicações, tais como: meningites, encefalites, espondilites, artrites supurativas e endocardites; na forma crônica a doença pode durar anos (Acha & Szyfres 1986).

### **1.5 Patogenia e sinais clínicos**

O período de incubação, que compreende o espaço de tempo da infecção ao aparecimento de anticorpos, varia de duas semanas a seis meses, em função da suscetibilidade do animal, da dose de brucelas para produzir a infecção, da via de infecção e do período de prenhez da vaca (Campaña et al. 2003). Experimentalmente se concluiu que esse período é variável e, quanto mais adiantada a prenhez, mais curto é o período de incubação (Acha & Szyfres 1986).

Ao atravessarem a porta de entrada, as bactérias se multiplicam nos gânglios linfáticos regionais, que aumentam de volume por causa da hiperplasia linfática, reticuloendotelial e inflamação. Se as bactérias sobreviverem nos linfonodos regionais, por meio do sangue ou linfa, se disseminam por todo o organismo, indo para os órgãos ou tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como gânglios, baço, fígado, medula óssea e articulações, onde originam os higromas. Disseminam-se para os órgãos reprodutivos, como o útero gravídico das fêmeas (feto e anexos embrionários-cotilédones), glândula mamária e os testículos, epidídimo, ampolas e vesículas seminais dos machos. As lesões nesses órgãos são de natureza necrótica e as bactérias podem se localizar em articulações, tendões e bolsas serosas (Campaña et al. 2003).

No útero gravídico, as bactérias se multiplicam no trofoblasto do placentoma, que leva a uma placentite pela infecção das células adjacentes e essas lesões inflamatório-necróticas dos placentomas impedem a passagem de oxigênio para o feto, que se encontra altamente infectado e desencadeia o aborto (Brasil 2003). Na placenta, líquidos fetais (especialmente o alantoideano), e nos cotilédones, a existência de grandes quantidades de eritritol, um hidrato de carbono, que estimula a multiplicação das brucelas, explica a suscetibilidade dos tecidos fetais dos bovinos (Acha & Szyfres 1986). A exceção é a estirpe B19, única incapaz de oxidar o eritritol, tendo, inclusive, seu crescimento inibido por ele. Todavia, algumas estirpes da B19 são tolerantes ao eritritol, e acredita-se que essa seja uma das causas do possível desenvolvimento de infecção persistente pela B19 e subsequente abortamento (Bishop et al. 1994).

Após o primeiro aborto, com o desenvolvimento da imunidade celular, há diminuição do número e tamanho das lesões de placentomas, reduzindo a frequência dos abortos, quando se iniciam as manifestações de natimortos ou nascimento de bezerros fracos e a retenção de placenta (Brasil 2003).

Os sinais clínicos no touro podem se manifestar como orquite, abscessos, perda da libido e, como consequência, esterilidade (Acha & Szyfres 1986).

## **1.6 Resposta imunológica**

Ao penetrar no organismo de um animal suscetível, a bactéria é englobada pelos macrófagos, resiste à destruição intracelular e consegue se multiplicar dentro destes, que é um ambiente livre de anticorpos. Em razão dessa habilidade, a proteção contra a infecção e a eliminação da bactéria do organismo hospedeiro dependem primariamente da resposta imune mediada por células. Tal resposta se dá pela interação de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) e de linfócitos T auxiliares (Th) e citotóxicos (CTL).

A chave para sobrevivência de bactérias intracelulares é o reconhecimento das condições ambientais e a rápida alteração da expressão de genes (Ficht 2003). Além da mutação genética, outros recursos para sobrevivência intracelular são utilizados pelas brucelas, tais como: parasitismo intracelular facultativo, bloqueio à fusão do fagossomo-lisossomo, parede celular resistente às enzimas lisossomais, cápsula antifagocítica e elaboração de um fator que é possivelmente um antígeno de superfície e

que retarda a destruição bacteriana (Frenchick et al. 1985, Kreutz et al. 2001, Campaña et al. 2003). Tais estratégias são responsáveis pelo caráter crônico da doença, visto que as brucelas se encontram em ambiente protegido da ação de antibióticos, do complemento e de anticorpos específicos (Collins & Campbell 1982, Kreutz et al. 2001, Gorvel & Moreno 2002).

Além da resposta mediada por células à *B. abortus*, a resposta humoral também é ativada. Para o entendimento dessa resposta, cabe lembrar a composição química das brucelas de morfologia colonial lisa, as quais possuem uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático que abriga uma camada de peptídeoglicano, e uma parede externa. Na parede externa existe uma estrutura formada por moléculas de constituição lipopolissacarídica (LPS), composta de lipídios A, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta, denominada cadeia O. A cadeia O é o componente antigênico mais importante da bactéria, responsável pela imunidade humoral às brucelas lisas, tendo um papel essencial no sorodiagnóstico (Metcalf et al. 1994, Paulin & Ferreira Neto 2003).

Os anticorpos dirigidos contra o LPS de *Brucella* sp. têm sido bastante estudados, de modo especial por serem detectados com facilidade em provas sorológicas. A resposta humoral de bovinos infectados por *B. abortus* ou vacinados com B19 caracteriza-se pela síntese dos três isótipos principais de imunoglobulinas. A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação produz-se a partir da primeira semana, aparecendo em primeiro lugar, o isótipo IgM e logo após, o IgG, subclasse IgG1. As respostas do isótipo IgA e da subclasse IgG2 aparecem mais tarde, aumentam gradativamente, mas permanecem em níveis baixos. A observação por períodos prolongados da resposta humoral em animais infectados demonstra que há um leve decréscimo dos níveis de IgM, enquanto que os de IgG1 permanecem altos, inalterados. A IgG2 e IgA permanecem em níveis mais baixos e estáveis (Acha & Szyfres 1986, Crawford et al. 1990, Brasil 2003).

A IgG está relacionada estreitamente com o estímulo antigênico da bactéria; sua presença é decorrente de um estado infeccioso crescente, ativo ou crônico. Daí que, nos casos de infecção crônica de brucelose bovina, a principal imunoglobulina presente no soro dos animais é a IgG. O eventual desaparecimento da IgG do soro de um bovino geralmente significa a eliminação da infecção por brucelose. Entretanto, quando de trata de estímulo vacinal em fêmeas bovinas, o organismo também sintetiza IgM e IgG.

Porém, as IgG originadas pela vacina tendem a desaparecer cerca de seis meses após a vacinação, o que reduz a possibilidade de confundir uma reação por vacinação de uma por infecção, quando se utilizam os testes sorológicos apropriados com fins diagnósticos, aplicados em fêmeas maiores de 24 meses de idade, que já foram vacinadas entre três e oito meses de idade (Campaña et al. 2003). Enquanto que, se a vacinação for realizada após os oito meses de idade, os títulos vacinais tendem a permanecer elevados por mais tempo, podendo gerar reações falso-positivas nos testes indiretos de diagnóstico (Brasil 2003).

Na brucelose, a imunidade humoral tem pequena participação na proteção dos animais, porém, como já foi mencionado, são de importância no diagnóstico sorológico da brucelose (Brasil 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

### **1.7 Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial da brucelose bovina pode ser realizado por métodos diretos e indiretos. O método direto baseia-se no isolamento do agente a partir de tecidos de fetos abortados, placenta, secreções vaginais, gânglios, leite e sêmen. É o método diagnóstico mais seguro, no entanto, apresenta dificuldades tanto de colheita e conservação das amostras quanto de procedimentos de execução da técnica (Poester 1997).

A técnica de inoculação em animais de laboratório, para posterior isolamento e identificação do agente, tende a ter seu uso diminuído, com o bom desempenho de outros métodos e a consciência ética relativa à utilização de animais de laboratório em pesquisas. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) e técnicas imunohistoquímicas são utilizadas com a finalidade de caracterização das brucelas em materiais suspeitos (Guarino et al. 2000, Paulin & Ferreira Neto 2003). A PCR pode ser utilizada como técnica complementar ao isolamento em cultivo e detecta um segmento de deoxyribonucleic acid (DNA) específico para determinada sequência de DNA bacteriano presente nas secreções e excreções provenientes de material de aborto. A técnica é efetiva, mas exige pessoal treinado, experiente e equipamentos sofisticados (Paulin & Ferreira Neto 2003).

Os métodos indiretos ou sorológicos são os mais utilizados para estudo em grandes rebanhos (Alton et al. 1976, Olascoaga 1976, Megid et al. 2000). Os testes de aglutinação são largamente empregados no diagnóstico das infecções bacterianas, em

particular as que envolvem bactérias gram-negativas, tais como *Brucella* sp. Consistem na detecção de anticorpos no soro, no leite, no plasma seminal ou no muco vaginal, e são os mais utilizados, por serem rápidos, não apresentarem dificuldade de execução, de baixo custo e apresentarem boa sensibilidade e especificidade (Paulin & Ferreira Neto 2003).

O diagnóstico indireto pode ser realizado por meio de vários testes, dentre eles o do AAT, teste da SAL, teste do 2-ME, teste *Rap*, ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISAs), ensaio homogêneo de fluorescência polarizada (FPA), fixação de complemento (FC) e o teste do anel do leite (TAL).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) preconiza para triagem o teste do AAT, descrito por Alton (1976) e, como confirmatório, o teste do 2-ME, em paralelo com o teste SAL. O teste de FC, realizado por laboratório oficial credenciado, está recomendado para testar animais reagentes ao teste do AAT, animais que apresentarem resultado inconclusivo ao teste do 2-ME, e para o trânsito internacional de animais. O TAL está previsto para o levantamento e monitoramento em rebanhos leiteiros.

O teste do AAT é qualitativo, rápido e prático (Vasconcelos et al. 1987, OMS 1986, Paulin & Ferreira Neto 2003), sendo de alta sensibilidade (99,2 %), mas de menor especificidade (98,9 %) (Stemshorn et al. 1985) quando comparado às outras provas. O antígeno é uma suspensão de *B. abortus* amostra 1119-3 inativada, corada pelo rosa-de-bengala e diluída a 8% em solução-tampão pH 3,65. Esse antígeno é padronizado por comparação com antígeno padrão de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Produz resultados satisfatórios como método diferencial em soros de animais não vacinados e suspeitos ao exame clínico e sorológico, em decorrência de seu pH ácido, que inibe algumas aglutininas inespecíficas, o que torna o teste seletivo para identificação da subclasse IgG1 (Vasconcelos et al. 1987, Megid et al. 2000). A aglutinação direta de anticorpo com o antígeno particulado (bactéria), resulta na formação de complexos insolúveis. A aglutinação das partículas indica a presença de anticorpos específicos para o antígeno.

As principais causas de resultados falso-positivos no diagnóstico sorológico da brucelose bovina são decorrentes de três fatores distintos: a) atividade residual de anticorpos induzidos pela vacinação de bezerras com idade superior a oito meses, uma

vez que quanto maior a idade de vacinação, mais tarde desaparecem os anticorpos vacinais (Paulin & Ferreira Neto 2003); b) anticorpos colostrais e erro laboratorial (Radostits et al. 2002); e c) reação cruzada com outras bactérias gram-negativas. Experiências realizadas com anticorpos monoclonais revelaram que o sorotipo 09 de *Yersinia enterocolitica* possui uma cadeia de lipopolissacarídeo O idêntica à de *B. abortus*, fator este responsável pela ocorrência das reações cruzadas (Kittelberg et al. 1998, Garin-Bastuji et al. 1999). A infecção por *Y. enterocolitica* sorotipo 09 representa a mais importante fonte de reação falso-positiva no diagnóstico da brucelose animal (Ferraz 1999).

As principais causas de resultados falso-negativos no diagnóstico sorológico da brucelose bovina são decorrentes de três fatores distintos: a) fenômeno prozona, inibição da aglutinação pela presença de concentrações altas de anticorpos, ou seja, ausência de sinal de aglutinação nas diluições mais baixas dos testes de ligação secundária; quando o soro é diluído, o resultado converte-se em positivo; b) infecção recente, embora se saiba que ao redor de trinta dias pós-infecção os animais exibem quantidades detectáveis tanto de IgM como de IgG (Crawford et al. 1990); e c) período pré e pós-parto ou aborto, 15 dias antes e 20 a 30 dias após, as fêmeas podem apresentar baixos títulos, quando ocorre a mobilização de anticorpos para o colostro e também para os líquidos fetais (Brandon et al. 1971, Poester et al. 1998). Para contornar essa última situação, o Regulamento Técnico do PNCEBT estabelece que fêmeas submetidas a testes sorológicos de diagnóstico para brucelose no intervalo de 15 dias antes até 15 dias após o parto deverão ser retestadas 30 a 60 dias após o parto.

O teste 2-ME, usado como confirmatório da enfermidade, baseia-se no tratamento prévio do soro com uma solução que contém 2-mercaptoetanol, composto que contém o radical tiol, que destrói os anticorpos da classe IgM e detecta exclusivamente IgG (Poester et al. 1997, Megid et al. 2000, Cavalléro 1998), o que permite determinar o estado de infecção ativa (Samartino et al. 2000, MacMillan 1990, Alton et al. 1988). Os resultados positivos obtidos por esse teste estão relacionados com a infecção, porém os resultados inconclusivos devem ser definidos por outras provas, como a fixação de complemento ou os animais devem ser retestados em um prazo de 30 a 60 dias e a interpretação é feita simultaneamente com o SAL, conforme preconizado pelo PNCEBT.



O TAL é recomendado em investigação e vigilância epidemiológica, tem alta sensibilidade (97,7%) (Huber & Nicoletti 1986) e baixo custo, é rápido e prático, tem como fundamento a detecção de anticorpos da classe IgA presentes no leite. A interação do anticorpo com o antígeno, corado pela hematoxilina ou tetrazólio, permite a formação da malha de aglutinação que se une à gordura e flutua para a superfície da amostra, evidenciada pelo anel colorido (Nielsen 1995).

Um dos problemas relacionados com o diagnóstico da brucelose bovina em rebanhos vacinados é quanto aos animais considerados suspeitos, que podem se tratar de reações inespecíficas, reação vacinal ou, ainda, a doença estar na fase crônica, apresentando títulos baixos. O ideal seria contar com um teste confirmatório com alta especificidade e boa sensibilidade, a fim de que um animal detectado no teste de triagem não permaneça no rebanho (Costa et al. 1999).

Os testes imunoenzimáticos com melhores resultados para o diagnóstico da brucelose são o ELISA indireto (I-ELISA) e o ELISA competitivo (C-ELISA). Naquele, o antígeno LPS-O é imobilizado sobre uma matriz de poliestireno e como conjugado utiliza um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugada com peroxidase. Possui alta sensibilidade (92,5%-100%), entretanto, a especificidade (90,6%-100%) (Nielsen 2002) assemelha-se à do AAT. O ELISA competitivo (C-ELISA), também dirigido ao antígeno LPS-O, é baseado na competição entre duas populações de anticorpos por um número limitado de determinantes antigênicos, e o grau de competição é proporcional à quantidade de anticorpos no soro. É um teste que apresenta alta sensibilidade (97,5%-100%) e especificidade (99,7%-99,8%) (Nielsen 2002), aprovado pela OIE, assim como a FC, como teste confirmatório para o diagnóstico da brucelose (Brasil 2003).

O FPA utiliza antígeno de LPS-O de *B. abortus* conjugado com isotiocianato de fluoresceína. A leitura é feita em dois minutos pelo analisador de polarização fluorescente e baseia-se nas diferenças rotacionais entre o LPS e o complexo antígeno-anticorpo (LPS mais o anticorpo presente no soroteste). A avaliação do desempenho do FPA comparada ao AAT e FC revelou 99,1% de especificidade e 95,5% de sensibilidade (Samartino et al. 1999).

### **1.7.1 Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo**

A *performance* de um teste pode ser avaliada por características intrínsecas, como sensibilidade e especificidade, e por características extrínsecas, como valores preditivos

positivo e negativo. Sensibilidade (Sen) é a probabilidade de um animal infectado ser classificado como positivo pelo teste de diagnóstico. Testes de baixa sensibilidade resultam em maior número de falso-negativos. Especificidade (Esp) é a probabilidade de um animal sadio (não infectado) ter resultado negativo no teste de diagnóstico. Testes de baixa especificidade resultam em maior número de falso-positivos (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2001, Brasil 2003).

Os valores de Sen e Esp de um determinado teste dependem do ponto de corte e normalmente estão inversamente relacionados. Se o ponto de corte do teste diagnóstico for modificado para aumentar a sensibilidade, a especificidade diminuirá. De maneira inversa, se o ponto de corte do teste diagnóstico for modificado para elevar a especificidade, haverá perda da sensibilidade (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2001, Brasil 2003).

Em situações reais, o verdadeiro estado sanitário do animal (infectado ou não) não é conhecido, mas sim o resultado do teste. Por essa razão, é importante saber a proporção de animais com resultado positivo, que realmente estão infectados – valor preditivo positivo (VPP), e a proporção de animais com resultado negativo que não estão infectados – valor preditivo negativo (VPN). Esses parâmetros são determinados pelos valores de Sen e Esp do teste utilizado e pela prevalência da doença na população submetida ao diagnóstico, ou seja, variam em função da situação epidemiológica (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2001, Brasil 2003).

A proporção de falso-positivos é muito influenciada pela especificidade do teste utilizado, qualquer que seja a prevalência da doença. Para valores de prevalência muito baixos, mesmo um teste de boa especificidade (99%), resulta em alta proporção de falso-positivos. Assim, quando o diagnóstico é realizado em populações de baixa prevalência, deve ser utilizado teste de especificidade próxima de 100%. Se não houver um único teste com essa característica, poderão ser utilizados testes em série; o primeiro teste, ou de triagem, serve para detectar animais reagentes, os quais são submetidos a novo teste para diagnóstico confirmatório. O teste de triagem deve ter boa sensibilidade, ser barato e de fácil execução. O teste confirmatório deve ter alta especificidade. A realização de testes em série, quando se realiza o teste confirmatório nos indivíduos positivos para o teste de triagem, aumenta a especificidade do procedimento diagnóstico e diminui o número de falso-positivos (Noordhuizen et al. 1997, Belchior 2001, Brasil 2003). Com esses objetivos, no controle da brucelose, o PNCEBT, determina que o teste

do AAT seja realizado como triagem, seguido do teste confirmatório (2- ME ou FC) (Brasil 2001).

### **1.7.2 Diagnóstico diferencial**

Outras doenças que podem causar abortamento e, portanto, devem ser consideradas no estudo envolvendo o diagnóstico da brucelose são: campilobacteriose, leptospirose, diarreia viral bovina, tricomonose, rinotraqueíte infecciosa bovina, listeriose, vibriose, micoplasmoses, clamidioses, assim como aborto de origem não infecciosa (Blaha 1995, Paulin & Ferreira Neto 2003).

### **1.8 Controle**

Existe dificuldade em se recomendar estratégias para controle ou erradicação da brucelose que possam ser aplicáveis ou praticáveis em todas as circunstâncias, pois as medidas são, com frequência, afetadas por diversos fatores, entre os quais se incluem a taxa de infecção do rebanho, a taxa de aborto, se o sistema de manejo da fazenda é intensivo ou extensivo, se é rebanho de corte ou de leite, da precipitação do local, da cobertura vacinal do rebanho, da viabilidade ou necessidade de reposição de animais, da situação financeira do produtor, da proximidade de um laboratório de diagnóstico veterinário, da cooperação e envolvimento dos proprietários vizinhos no programa, dos preços e cotas de abate dos animais infectados, da disponibilidade de campos livres e locais adequados de parição, da disponibilidade da orientação de médicos-veterinários, e de facilidades para colher sangue de grandes quantidades de animais (Bishop et al. 1994, Cavalléro 1998).

A estruturação de um bom sistema de vigilância é extremamente importante no combate à brucelose bovina. Tradicionalmente é recomendado para verificar se a condição de livre está sendo mantida por rebanhos de uma dada região, todavia também pode ser bastante útil para eliminar os resíduos de doença na fase de erradicação, por meio da detecção de rebanhos infectados, também denominados focos. Um sistema de vigilância pode ser entendido como um conjunto de ações que visa a detectar de forma inteligente os focos de doença. Para o gado de corte, o sistema apóia-se no sorodiagnóstico de animais de reprodução, e os pontos estratégicos para colheita são os matadouros, os leilões, as exposições, os rodeios e as feiras. A adequada identificação dos animais permite o rastreamento das propriedades-foco. No caso do gado de leite, pode-se vigiar

toda uma região por meio do TAL aplicado a amostras de leite colhidas nas plataformas de recepção dos laticínios. Os rebanhos identificados pelo TAL são submetidos à sorologia individual, e, havendo animais soropositivos, são conduzidos às ações de saneamento (Paulin & Ferreira Neto 2003).

Estudos por amostragem, por vezes conduzidos para se conhecer melhor a situação epidemiológica da doença em determinada região, também podem servir para alimentar um sistema de vigilância, pois é possível detectar focos da doença. Os casos de aborto devem ser investigados, bem como as denúncias oriundas do sistema de notificação compulsória. Além disso, a investigação de rumores da presença da doença, por vezes tão freqüente entre as pessoas do meio rural, já provou ser eficiente na detecção de focos da doença e, sem dúvida, contribui para aumentar a sensibilidade do sistema de vigilância (Paulin & Ferreira Neto 2003).

Assim, algumas medidas são fundamentais para o sucesso de um programa de controle ou erradicação da brucelose bovina: técnicas de diagnóstico viáveis, cooperação e esforço conjunto entre médicos-veterinários e laboratórios de diagnóstico, registros precisos, educação de fazendeiros e da comunidade, estabelecimento de medidas de manejo da enfermidade, controle do movimento de bovinos, eliminação permanente de animais infectados e a vacinação das bezerras com três a oito meses de idade.

Essas medidas, aliadas a um estudo epidemiológico da brucelose no rebanho e associadas à adequação de manejo, contribuem para reduzir o tempo necessário ao controle e erradicação dessa zoonose (Viana et al. 1981). Atualmente, o PNCEBT contempla essas normas para o combate à doença, além de orientar para a conscientização e envolvimento da população para garantir melhora na produção do rebanho (Brasil 2001).

A vacinação com a B19 reduz a taxa de infecção em áreas de alta prevalência, é eficiente para prevenir o aborto e aumenta a resistência à infecção por ativação dos leucócitos, principalmente dos linfócitos T e macrófagos. A vacinação, quando utilizada de forma convencional, protege cerca de 65% a 70% dos animais vacinados contra o aborto (Paulin & Ferreira Neto 2003).

A vacina com a cepa RB51 de *Brucella abortus* foi desenvolvida nos Estados Unidos. É desprovida da cadeia O do LPS de *Brucella*, motivo pelo qual não induz anticorpos detectáveis. Em estudo desenvolvido com a vacina, não houve eliminação da cepa RB51

pelo leite, e não houve abortos induzidos por essa cepa. O fator foi estudado no período de maior produção láctea, fase de maior eliminação da bactéria por essa via, tanto em animais que abortam, quanto naqueles infectados que parem normalmente. O trabalho permitiu concluir que a vacina RB51 não tem efeitos residuais, quando aplicada até o sexto mês de prenhez em vacas vacinadas com a vacina B19, o que sugere que a vacina RB51 é adequada em programas de controle e erradicação da brucelose bovina, utilizando esse esquema (Samartino et al. 2003).

A preocupação em controlar, com vistas a erradicar a doença no Brasil, sempre esteve presente entre as autoridades sanitárias, embora a maioria das iniciativas nesse sentido tenha encontrado dificuldades em atingir os objetivos, uma vez que pelas próprias características, a brucelose requer um prazo longo para avaliar os resultados dos programas. Assim, em janeiro de 2001, o MAPA lançou o PNCEBT, por meio da Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, publicada no Diário Oficial da União de 11 de janeiro de 2001 (Brasil 2001).

### **1.8.1 Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose bovina (PNCEBT)**

O PNCEBT tem como objetivos baixar a prevalência e a incidência de novos casos de brucelose e tuberculose e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. As propostas técnicas do PNCEBT incluem: vacinação contra a brucelose, certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose; certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose, controle de trânsito de reprodutores e normas sanitárias para a participação em eventos e aglomerações de animais, credenciamento e capacitação de médicos-veterinários diagnóstico e apoio laboratorial, participação do serviço oficial e a educação sanitária, organizados de maneira que as ações sanitárias sejam executadas em conjunto com a sociedade e que essa se sinta responsável pelo sucesso do programa.

A brucelose bovina ocorre endemicamente em todo o território nacional, sendo *B. abortus* a de maior prevalência no País (Poester et al. 2002), porém em MS, são poucos os estudos que têm informações concretas sobre a prevalência dessa infecção em seu rebanho. Considerando a necessidade de se conhecer a magnitude da brucelose em MS, este estudo teve como objetivos estimar a soroprevalência para brucelose em animais e

em rebanhos bovinos, do estrato 1 desse Estado, e identificar os fatores de risco associados à presença da brucelose nessa região.

***ARTIGO***

# **INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BRUCELOSE BOVINA EM UM ESTRATO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência da brucelose bovina nos 22 municípios que compõem a região denominada estrato 1 do Estado de Mato Grosso do Sul, e identificar os fatores de risco associados à infecção. A região amostrada constitui uma área de 70.214,1 km<sup>2</sup>, que representa 19,7% do Estado. O rebanho de região estudada é de, aproximadamente, 5,7 milhões de cabeças, correspondente a 23% do efetivo de 24,9 milhões de bovinos de Mato Grosso do Sul. Nas 210 propriedades amostradas, no período de dezembro de 2003 a março de 2004, foram colhidas 2.376 amostras de sangue de fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, submetidas a testes diagnósticos em série. A triagem, realizada por meio do teste do antígeno acidificado tamponado, foi seguida pelo teste confirmatório 2-mercaptoetanol. Na mesma ocasião da colheita das amostras, foi preenchido um questionário com informações de identificação, tipo de criação e práticas de manejo. Em animais, a prevalência real foi estimada em 5,6% e em rebanhos, 37,3%. As variáveis que apresentaram associação, por meio da análise univariada *odds ratio* (OR), com a soropositividade à brucelose foram: o tipo de exploração corte (OR 2,82), a raça Zebu (OR 2,62), aborto (OR 1,83), a existência de áreas alagadiças na propriedade (OR 1,04) e o ingresso de animais nos rebanhos (OR 1,53). Os resultados demonstram que, além da brucelose ser prevalente no estrato estudado em Mato Grosso do Sul, o controle da doença pode consistir na adoção de programa com especial atenção à exploração do tipo corte, à raça Zebu e à presença do aborto.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, soroprevalência, rebanho

## **EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION OF BOVINE BRUCELLOSIS IN AN EXTRACT OF THE MATO GROSSO DO SUL STATE, BRAZIL**

### **ABSTRACT**

This study aimed to estimate the prevalence of bovine brucellosis in the 22 counties which make up the region called extract 1 of the State of Mato Grosso do Sul and identify the risk factors associated with that infection. The sample region encompasses an area of 70.214,1 km<sup>2</sup>, which represents 19,7% of the State. The cattle herd in the studied region has approximately 5,7 million individuals, corresponding to 23 % of the whole of 24,9 million of bovines in the State of Mato Grosso do Sul. In the 210 sample estates in the period between December 2003 and March 2004, 2.376 blood samples were collected from females aged 24 months or older, submitted to serial diagnostic tests. The sorting, carried on through the buffered acidified antigen test, was followed by the confirmatory 2-mercaptoetanol test. On the same occasion of the sample collection, a questionnaire with information related to the identification, kind of cattle and management practices was filled out. In animals the real prevalence was estimated in 5,6% and in cattle herd, 37,3%. The variables which presented association through odds ratio univariate analysis (OR) with serum positivity to brucellosis were: the exploration of beef cattle (OR 2,82), Zebu breed (OR 2,62), abortion (OR 1,83), the existence of flooding areas in the estate (OR 1,04) and the joining of animals to the herd (OR 1,53). The results demonstrate that, despite the prevalence of brucellosis in the extract studied in the State of Mato Grosso do Sul, the control of the disease may depend on the adoption of a program focusing on the exploration of beef cattle, the Zebu breed and the presence of abortion.

INDEX TERMS: Brucellosis, seroprevalence, herd



## 1 INTRODUÇÃO

O último diagnóstico nacional de situação da brucelose bovina foi realizado em 1975, tendo estimado a porcentagem de animais sororretores em 4% na região Sul, 7,5% na Sudeste, 6,8% na Centro-Oeste, 2,5% na Nordeste e 4,1% na Norte (Poester et al. 2002, Brasil 2003). Posteriormente, alguns Estados realizaram estudos sorológicos por amostragem, os quais não evidenciaram grandes alterações em relação aos índices nacionais verificados em 1975. No Rio Grande do Sul, a prevalência decresceu de 2% em 1975 para 0,3% em 1986, em Santa Catarina, passou de 0,2% em 1975 para 0,6% em 1996, em Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, semelhante à de 1975 no antigo Estado do Mato Grosso, em Minas Gerais passou de 7,6% em 1975 para 6,7% em 1980 e no Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% em 1989 (Paulin & Ferreira Neto 2003).

Levantamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), vinculado à Secretaria da Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), indica que a prevalência de animais soropositivos para brucelose no Brasil apresenta média de 4% a 5%. Os dados referem-se ao período entre 1988 e 1998, e indicam que a brucelose é uma das principais causas de aborto em bovinos (Poester et al. 2002, Brasil 2003).

Em Mato Grosso do Sul, além da prevalência estimada nos inquéritos realizados pelo MAPA, em 1975, e pelo Departamento de Inspeção e Defesa Agropecuária de Mato Grosso do Sul (IAGRO), atual Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), e MAPA, em 1998 (Cavalléro 1998), outros estudos foram conduzidos no Pantanal. Nessa região, com características peculiares de clima, topografia, hábitos e manejo do rebanho, onde existem aproximadamente 3,1 milhões de bovinos e a prática de vacinação é pontual, Pellegrin et al. (1999), no período de 1995 a 1997, realizaram estudo em 26 fazendas e coletaram 495 amostras. Dez propriedades apresentaram animais sorologicamente positivos para brucelose, sendo a prevalência global de 3,43% (Intervalo de confiança (IC) 95%: 1,40-5,47).

Na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, um levantamento realizado entre 1982 e 1984 revelou 10,2% de animais reagentes positivos (Cavalléro 1998) e Almeida (2001), ao examinar 989 soros de bovinos de MS, obteve 8,6% de soropositividade no

teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 9% no teste *Rapid Automated Presumptive (RAP)*.

As perdas econômicas são decorrentes dos sucessivos abortamentos e período de esterilidade temporária, responsáveis pela redução das taxas de natalidade, aumento do intervalo entre partos, nascimentos prematuros, interrupção de linhagens genéticas, esterilidade e baixa produção de leite dos rebanhos (Campaña et al. 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003). Avaliações realizadas em países com programas consistentes de controle apontam que a brucelose é responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e de carne, pela redução de 15% na produção de bezerros e pelo aumento do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses. Mostram ainda que, em cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou torna-se permanentemente estéril (Brasil 2003). No Brasil, os prejuízos econômicos ocasionados pela brucelose bovina ou bubalina foram estimados, em 1971, pelo MAPA, em US\$ 32 milhões as perdas anuais, considerando somente os abortos e a queda na produção leiteira (OIE 1987, Poester et al. 2002). A transmissão da brucelose entre rebanhos deve-se aos fatores: aquisição de animais infectados; proximidade a rebanhos infectados, que compartilham pastagem e água, e animais que se alimentam de outros em decomposição.

Dentro do rebanho, os principais fatores que influenciam a transmissão da enfermidade são: o nível de vacinação, tamanho do rebanho, condições de instalações, uso de piquete maternidade e densidade populacional (Crawford et al. 1990). No Brasil, em levantamentos oficiais realizados nas diferentes regiões, a doença apresenta-se de forma endêmica e as maiores prevalências estão nas regiões com maior densidade bovina (Poester et al. 2002).

Em decorrência da implantação do PNCEBT (Brasil 2001), o MAPA definiu a necessidade de se estimar a prevalência da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso do Sul. Para tanto, a coordenação do Programa, para efeito do levantamento soroepidemiológico, dividiu o Estado, composto de 78 municípios, em quatro estratos.

Os objetivos desse estudo foram estimar a prevalência dos rebanhos bovinos infectados com *B. abortus* nos 22 municípios que compõem o estrato 1 e relacionar a ocorrência da brucelose com o tipo de criação, práticas de manejo e fatores de risco.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

A metodologia baseou-se no inquérito soroepidemiológico da brucelose proposto pelo MAPA às unidades federativas, visando a traçar o diagnóstico situacional da doença e este servir como parâmetro de avaliação para o PNCBET. Dessa forma, a ocorrência da brucelose foi estimada por um processo amostral, que detectou a prevalência de propriedades e de animais com a infecção, e os resultados foram extrapolados para o estrato em estudo.

### **2.1 Amostragem**

#### **2.1.1 Área de estudo**

Realizou-se o presente estudo na região denominada estrato 1 do Estado de Mato Grosso do Sul. Esse estrato, composto de 22 municípios (Tabela 1), faz parte da estratificação realizada pela coordenação estadual do PNCEBT, em quatro estratos distintos, com número de rebanhos equivalentes.

O estrato considerado abrange municípios pertencentes a três das quatro mesorregiões geográficas do Estado: centro-norte, leste e sudoeste (IBGE 2002), os quais possuem propriedades de extensão variada, dedicadas

Z= valor de Z de acordo com o grau de confiança determinado

P= prevalência esperada ou mais provável

d= precisão absoluta aceitável

A amostragem resultou em 207 e decidiu-se por 210 propriedades (Tabela 1).

A escolha aleatória das propriedades seguiu a listagem das fichas sanitárias fornecidas pela IAGRO, após o cálculo do intervalo amostral, que se deu por meio da divisão do número total de propriedades pelo número de propriedades a serem amostradas. Em cada propriedade sorteada, o rebanho-alvo foi o de principal objetivo da produção e representado por animais nas mesmas condições de manejo.

Após o sorteio das propriedades procedeu-se o sorteio dos animais, fêmeas, de idade igual ou superior a 24 meses, para serem sangradas. Em cada propriedade sorteada, onde existiam até 99 fêmeas na faixa etária igual ou superior a dois anos, foram amostradas dez fêmeas, ou todas as fêmeas dessa faixa etária, se elas fossem menos do que dez. Naquelas, onde o número de fêmeas de idade igual ou superior a dois anos era superior a 99, foram amostradas 15 fêmeas dessa faixa etária.

A seleção das fêmeas sangradas foi feita de forma aleatória, empregando-se o método de amostragem aleatória simples ou sistemática. A escolha por um dos métodos foi definida dividindo o total de fêmeas com idade igual ou superior a dois anos existentes na propriedade pelo total de fêmeas a serem amostradas. Para resultados inferiores a dois, foi empregado o método de amostragem aleatória simples; nos casos em que o resultado era superior a dois, foi empregado o método de amostragem aleatório sistemático. A Tabela 1 sumariza os resultados dos cálculos realizados para escolha das propriedades amostradas e para a escolha das fêmeas que foram sangradas.

Tabela 1 - Rebanhos e animais amostrados, por município, do estrato estudado

Município	Rebanhos amostrados	Animais amostrados
Angélica	6	44
Bandeirantes	8	110
Caarapó	8	87
Campo Grande	18	206
Deodápolis	9	78
Douradina	2	20
Dourados	17	164
Fátima do Sul	5	36
Glória de Dourados	9	82
Itaporã	6	60
Ivinhema	14	134
Jaraguari	10	104
Jateí	7	76
Maracaju	10	140
Nova Alvorada do Sul	8	110
Novo Horizonte do Sul	10	125
Ribas do Rio Pardo	18	212
Rio Brilhante	6	80
Rochedo	6	78
Sidrolândia	17	235
Terenos	11	145
Vicentina	5	50
Totais	210	2.376

### 2.1.3 Obtenção das amostras

As amostras de sangue foram colhidas durante o período de dezembro de 2003 a março de 2004, por punção jugular, com agulha descartável, uma para cada animal e transportadas para o Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais (LADDAN), da IAGRO. Os soros sangüíneos obtidos foram estocados a -20° C e, depois, submetidos aos testes de diagnóstico de brucelose.

### 2.2 Testes diagnósticos

Para o diagnóstico foram empregados testes em série, visando a aumentar a especificidade (Thrusfield 1984). Como teste de triagem foi realizado o teste do AAT e os soros reagentes nesse foram submetidos ao teste confirmatório do 2- Mercapto-etanol (2-ME).

Os testes de AAT e 2-ME foram feitos no LADDAN, segundo protocolo preconizado pelo manual técnico do PNCEBT. No teste do AAT foi utilizado o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3.65) e as bactérias coradas com rosa-de-bengala, e no teste do 2-ME foi utilizado o antígeno para prova de soroaglutinação

lenta, com concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 119-3 de *Brucella abortus*, inativado pelo calor, ambos os antígenos produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

Como os testes diagnósticos utilizados foram empregados em série, os cálculos de especificidade serial (EspS) e de sensibilidade serial (SenS) foram feitos de acordo com Noordhuizen et al. (1997) e utilizadas as seguintes fórmulas:

**SenS = Sen1\* Sen2;** onde:

Sen1= sensibilidade do teste 1 (AAT)

Sen2 = sensibilidade do teste 2 (2-ME)

**EspS = 1-(1-Esp1)\*(1-Esp2),** onde:

Esp1 = especificidade do teste 1 (AAT)

Esp2 = especificidade do teste 2 (2-ME)

Os cálculos foram baseados, para o AAT, em Davies (1971) a partir dos valores de sensibilidade (0,996) e de especificidade (0,831). Para o 2-ME baseou-se em Vasconcellos et al. (1987) a partir da sensibilidade (0,95) e especificidade (0,92).

Os resultados dos testes diagnósticos foram positivos, negativos ou inconclusivos e classificou-se como positiva a propriedade que apresentou pelo menos um animal positivo no teste confirmatório (2-ME); negativa, quando todas as fêmeas apresentaram-se negativas nos testes sorológicos e inconclusiva, quando existiram resultados sorológicos negativos e inconclusivo em pelo menos uma das fêmeas.

## **2.3 Questionário**

De forma simultânea à colheita de sangue em cada propriedade, foram realizados entrevista e preenchimento de um questionário de estudo soroepidemiológico que incluía informações de identificação, tipo de criação, práticas de manejo, características relacionadas com as propriedades e registros sobre as amostras colhidas.

## **2.4 Banco de dados**

O resultado dos testes de diagnóstico e as informações do questionário aplicado em cada propriedade foram armazenados em um banco de dados, utilizando o programa Microsoft Access 97®, desenvolvido para o PNCEBT.

## 2.5 Análise estatística

### 2.5.1 Prevalência de animais infectados

De início foi estimada a prevalência aparente ( $P_a$ ) (Noordhuizen et al. 1997), por meio da seguinte fórmula:

$$P_a = n/N; \text{ onde:}$$

$n$  = número de animais positivos no teste 2-ME

$N$  = número total de animais testados

A estimativa da prevalência deve ser ajustada para a sensibilidade e especificidade do teste. Então, calculada a  $P_a$  estimou-se a prevalência real ( $P_r$ ) (Martin et al. 1992) por meio da seguinte fórmula:

$$P_r = \text{SenS} \times P_a + (1 - \text{EspS}) \times (1 - P_a); \text{ onde}$$

$\text{SenS}$  = sensibilidade serial

$P_a$  = prevalência aparente

$\text{EspS}$  = especificidade serial.

$\text{SenS}$  e  $\text{EspS}$  obtidas conforme item 2.2.

### 2.5.2 Prevalência de rebanhos infectados

A prevalência aparente de rebanho ( $P_{aR}$ ) (Martin et al. 1987) foi estimada por meio da seguinte fórmula:

$$P_{aR} = n/N; \text{ onde:}$$

$n$  = número de rebanhos classificados como positivos

$N$  = número total de rebanhos testados

A estimativa da prevalência aparente de rebanho ( $P_{aR}$ ) deve ser ajustada para a sensibilidade e especificidade de rebanho (item 2.5.3). Então, calculou-se a  $P_{rR}$  de acordo com Martin et al. (1992), utilizando a seguinte fórmula:

$$P_{rR} = (P_{aR} + \text{EspR} - 1) / (\text{SenR} + \text{EspR} - 1); \text{ onde:}$$

$P_{aR}$  = prevalência aparente de rebanho

$\text{EspR}$  = especificidade de rebanho

$\text{SenR}$  = sensibilidade de rebanho

Os intervalos de confiança (IC) das prevalências aparente e real de animais e de rebanho foram calculados para uma confiança de 95%, conforme Martin et al. (1987), por meio da seguinte fórmula:

**IC = valor estatístico  $\pm$  (z \* EP); onde:**

z = 1,96 (Sampaio 1998)

EP = erro padrão

### **2.5.3 Estimativa da sensibilidade e especificidade de rebanho**

A sensibilidade de rebanho (SenR) pode ser traduzida como a probabilidade de um rebanho positivo ser corretamente identificado como infectado, pelo teste aplicado nos animais. A especificidade de rebanho (EspR) é a probabilidade de rebanhos negativos serem corretamente identificados como não infectados, por um teste aplicado nos indivíduos. A SenR e EspR foram estimadas de acordo com Noordhuizen et al. (1997). Considerou-se o ponto de corte igual a um, significando que o achado de apenas um animal positivo no rebanho já o classificava como rebanho positivo.

Calculou-se SenR e EspR de cada propriedade classificada como positiva e, com a média aritmética destas, a SenR e EspR do estrato.

**SenR = 1 - (1 - Pa)<sup>n</sup>, onde**

Pa = prevalência aparente

1 - Pa é a probabilidade de testar um animal e este resultar negativo, e

(1-Pa)<sup>n</sup> é a probabilidade de testar os “n” animais e todos serem negativos

<sup>n</sup> = número de animais testados por propriedade

**EspR = EspS<sup>n</sup>, onde:**

EspS = especificidade serial

<sup>n</sup> = número de animais testados por propriedade



#### 2.5.4 Valores preditivos

Os valores preditivos são considerados como características populacionais (extrínsecas ao teste), pois dependem da prevalência real da doença. O valor preditivo positivo (VPP) indica a proporção de animais, com resultado positivo no teste, que realmente têm a infecção. O valor preditivo negativo (VPN) indica a proporção de animais com resultado negativo no teste que estão realmente livres da infecção.

O VPP e o VPN do diagnóstico do rebanho foram estimados de acordo com Noordhuizen et al. (1997), por meio das seguintes fórmulas:

$$\text{VPP} = \text{Pr} * \text{SenR} / (\text{Pr} * \text{SenR} + (1 - \text{Pr}) * (1 - \text{EspR}))$$

$$\text{VPN} = (1 - \text{Pr}) * \text{EspR} / \text{Pr} * (1 - \text{SenR}) + (1 - \text{Pr}) * \text{EspR}; \text{ onde:}$$

Pr = prevalência real

SenR = sensibilidade de rebanho

EspR = especificidade de rebanho

#### 2.6 Análise dos fatores de risco

Para o estudo dos fatores de risco associados à soropositividade para *Brucella abortus*, foi realizada análise univariada por meio da estimativa intervalar da *odds ratio* (OR), executada com o auxílio do programa Win Episcopo 2.0.

### 3 RESULTADOS

A Tabela 2 registra o resultado obtido no teste confirmatório (2-ME) realizado nas amostras positivas no teste de triagem (AAT), dos diferentes municípios do estrato estudado.

Tabela 2 - Resultado do teste confirmatório, após triagem, em animais, por município

Município	Positivos na triagem	2-mercaptoetanol		
		Negativos	Positivos	Inconclusivos
Angélica	2	1	1	-
Bandeirantes	10	1	8	1
Caarapó	11	5	6	-
Campo Grande	33	18	15	-
Deodápolis	10	2	8	-
Douradina	3	2	1	-
Dourados	22	6	14	2
Fátima do Sul	1	0	1	-
Glória de Dourados	4	2	2	-
Itaporã	1	0	1	-
Ivinhema	11	4	6	1
Jaraguari	19	7	10	2
Jateí	12	8	4	-
Maracaju	8	0	8	-
Nova Alvorada do Sul	14	5	6	3
Novo Horizonte do Sul	10	2	7	1
Ribas do Rio Pardo	24	5	19	-
Rio Brilhante	5	1	4	-
Rochedo	10	5	5	-
Sidrolândia	33	13	18	2
Terenos	28	12	11	5
Vicentina	3	0	2	1
Totais	274	99	157	18

A Tabela 3 registra o número de propriedades classificadas como positivas e inconclusivas, nos rebanhos amostrados por municípios.

Tabela 3 - Classificação dos rebanhos segundo o teste confirmatório 2-ME, em propriedades amostradas por município

Municípios	Rebanhos amostrados	Classificação da propriedade*	
		Rebanho positivo	Rebanho inconclusivo
Angélica	6	1	-
Bandeirantes	8	6	-
Caarapó	8	3	-
Campo Grande	18	6	-
Deodápolis	9	3	-
Douradina	2	1	-
Dourados	17	7	1
Fátima do Sul	5	1	-
Glória de Dourados	9	2	-
Itaporã	6	1	-
Ivinhema	14	4	-
Jaraguari	10	7	-
Jateí	7	2	-
Maracaju	10	5	-
Nova Alvorada do Sul	8	4	1
Novo Horizonte do Sul	10	4	-
Ribas do Rio Pardo	18	7	-
Rio Brilhante	6	2	-
Rochedo	6	2	-
Sidrolândia	17	8	-
Terenos	11	6	1
Vicentina	5	1	1
	210	83	4

\* Ponto de corte igual a 1

Dos 2.376 animais examinados, 274 foram positivos no teste de triagem (AAT). Desses, 157 foram confirmados por meio do teste 2-ME e 18 resultaram inconclusivos. Dos 210 rebanhos amostrados, 83 foram positivos, quatro inconclusivos e 123 negativos; classificando as propriedades como: positivas, inconclusivas e negativas, respectivamente.

Os percentuais de prevalência aparente (Pa) e prevalência real (Pr) de animais positivos e inconclusivos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Prevalências aparente e real obtidas a partir dos testes diagnósticos em série, nos 2.376 animais amostrados

Animais	Prevalência aparente			Prevalência real*		
	%	IC inferior	IC superior	%	IC inferior	IC superior
Positivos (n=157)	6,6	5,6	7,6	5,6	5,1	6,2
Inconclusivos (n=18)	0,8	0,4	1,2	0,0	0,0	0,2

\* SenS = 94,6% e EspS= 98,7% Intervalo de confiança (IC) de 95%

Os percentuais de prevalência aparente (Pa) e prevalência real (Pr) das propriedades classificadas como positivas e inconclusivas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Prevalências aparente e real obtidas a partir da classificação das propriedades amostradas

Propriedades	Prevalência aparente			Prevalência real*		
	%	IC inferior	IC superior	%	IC inferior	IC superior
Positivas (n=83)	39,5	32,9	46,1	37,3	33,3	41,4
Inconclusivas (n=4)	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1

\* SenR = 70,0% e EspR = 84,0% Intervalo de confiança (IC) de 95%

A Tabela 6 sumariza os percentuais de PaR, PrR, VPP e VPN.

Tabela 6 - Prevalência aparente, prevalência real e valores preditivos das propriedades pesquisadas

Rebanhos positivos (n=83)	%
Prevalência aparente	39,5
Prevalência real*	37,3
Valor preditivo positivo	74,6
Valor preditivo negativo	87,1

\* SenR = 70,0% e EspR = 84,0%

As variáveis que apresentaram associação com a soropositividade para brucelose estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Fatores de risco componentes da brucelose nos rebanhos estudados com os respectivos valores das *odds ratio* (OR)

Variáveis	Descrição	Positivos	Negativos	OR	IC % inferior	IC% superior
Exploração	Corte	40	38			
	Leite	25	67	2,82	1,49	5,34
	Corte	40	38			
	Mista	18	18	1,05	0,48	2,32
	Leite	25	67			
Raça	Mista	18	18	0,37	0,17	0,83
	Zebu	42	36			
Aborto	Mestiço	29	65	2,62	1,40	4,88
	Sim	33	33			
Ingresso de animais	Não	48	88	1,83	1,01	3,33
	Compra animais	41	42			
Vacinação	Não compra animais	48	75	1,53	0,87	2,68
	Não vacina	15	20			
Fonte de contaminação	Vacina	68	103	1,14	0,54	2,37
	Existe área alagadiça	62	91			
Reprodução	Não existe	21	32	1,04	0,55	1,97
	Touro	72	111			
	Inseminação artificial e touro	9	10	0,72	0,28	1,86

Intervalo de confiança (IC) de 95%

## 4 DISCUSSÃO

A inexistência de dados de prevalência divulgados em meios científicos sobre a brucelose bovina no rebanho do Estado de Mato Grosso do Sul (MS) dificulta uma análise comparativa com a obtida neste estudo. No entanto, ao se confrontar a prevalência em animais para a região Centro-Oeste (6,8%), e para MS (6,3%) (Paulin & Ferreira Neto 2003), observa-se que a prevalência aparente obtida (6,6%) (Tabela 4) quase se equipara a essas. Diferente dos dados oficiais, publicados nos Boletins de Defesa Sanitária Animal, os quais mostram que a prevalência média de animais positivos no Brasil se manteve entre 4% e 5% no período entre 1988 e 1998 (Brasil 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

A prevalência real de 37,3% de brucelose no rebanho bovino do estrato 1 de MS (Tabelas 5 e 6), nas 210 propriedades amostradas é inferior à observada no Estado de Mato Grosso (MT) (INDEA 2004), que ao utilizarem metodologia semelhante encontraram 42,2%. A soroprevalência para brucelose em rebanhos estimada neste estudo é, também, bastante inferior à observada por Tocantins (2000) no baixo Pantanal de Cáceres, MT, onde a doença estava presente no rebanho bovino em cerca de 82% das propriedades estudadas. De forma semelhante, quando se analisa prevalência real em animais (5,6%) (Tabela 4) observa-se que a estimativa (INDEA 2004) para o MT é superior (10,25%).

A variação na distribuição da brucelose nos diferentes municípios e nas propriedades (Tabela 3) pode estar relacionada com os diversos fatores, como fonte de aquisição de animais, práticas de manejo e clima (Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002, Rosales et al. 2002).

Neste estudo foi observado que, no grupo dos animais positivos, há mais chances de ocorrência da infecção por *Brucella abortus* em decorrência do predomínio dos seguintes fatores de risco: sistema de exploração de corte (2,82), raça Zebu (2,62), aborto (1,83), compra de animais (1,53), não uso de vacina (1,14) e existência de área alagadiça na propriedade (1,04) (Tabela 7).

A constatação de que, dentre os animais positivos para a brucelose, os provenientes de rebanhos de corte têm 2,82 vezes mais chances de apresentarem a doença que os de rebanho leiteiro está de acordo com Campero et al. (2003) que, ao estudarem, na

Argentina, fetos abortados provenientes dos dois sistemas de exploração, isolaram o agente principalmente nos rebanhos de corte. Da mesma forma, Poester et al. (2002), no Brasil, afirmam que a brucelose é altamente prevalente em rebanhos de corte. Quando analisada a OR de exploração de corte e mista, essa relação (OR 1,05) foi próxima à equivalência. Dentre os animais positivos, os provenientes de rebanhos de leite têm relação negativa (OR 0,37) quando comparada com os provenientes de rebanho de exploração mista.

A predominância da soroprevalência em animais de corte e da raça Zebu (OR 2,62) pode ser justificada pelo ingresso de animais nesse tipo de exploração, pois essa variável também demonstrou relação positiva com a ocorrência da infecção. Além disso, na região Centro-Oeste, a bovinocultura de corte é constituída basicamente por gado zebu (Poester et al. 2002) e predomina o sistema de produção de recria e engorda, o que pressupõe o ingresso, muitas vezes, indiscriminado de animais.

A presença do aborto como fator de risco (OR 1,83) nesse estrato representa uma importante fonte de infecção, pois os animais podem se contaminar por meio dos fetos abortados, envoltórios fetais, descargas vaginais (Brautigam Rivera 1997, Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002, Campos et al. 2003).

O ingresso de animais nas propriedades constitui um risco verificado nessa análise, que resultou na relação positiva (OR 1,53). O recomendado é que na compra de animais, estes sejam testados na origem e retestados logo após a entrada no quarentenário, o que diminui as chances de introdução da infecção em propriedades livres (Sanderson et al. 2000, Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002).

A variável não utilização de vacina constituiu um pequeno risco verificado nessa análise (OR 1,14). Entretanto, cabe salientar que o período de realização da entrevista coincidiu com a exigência formal por parte da IAGRO quanto à vacinação antibrucelose, o que pode ter influenciado no nível de resposta, embora a pergunta tenha sido direcionada ao uso da vacina antes da instalação do PNCEBT.

A existência de áreas alagadiças nas propriedades foi constatada como fator de risco associado à soroprevalência da brucelose (OR 1,04). Embora próxima da equivalência, está de acordo com Acha & Szyfres (1986), Paulin & Ferreira Neto (2003), que relatam que a presença de rios e açudes dividindo lotes de animais de propriedades vizinhas,

sombreamento, umidade e baixas temperaturas favorecem a sobrevivência do agente no ambiente, o que aumenta o risco de transmissão.

O uso somente de monta natural nas propriedades não constituiu um risco entre os animais soropositivos, pois resultou em relação  $< 1$  (OR 0,72), quando comparado com a prática da inseminação artificial seguida de repasse com touros. Essa constatação está de acordo com Campero (1993), o qual considera que, embora os touros também possam participar da transmissão da brucelose, pois eliminam a brucela por meio do sêmen, não possuem papel tão marcante, por as fêmeas apresentarem as defesas naturais na vagina. Entretanto, assumem importância quando da inseminação artificial, pois, nesse caso, o sêmen é depositado diretamente no útero, escapando das barreiras naturais. Os processos de preparação, conservação e descongelamento do sêmen não comprometem a sobrevivência de brucelas. Todavia, se adotados todos os protocolos de triagem clínica e sorológica, pelas centrais de inseminação, a possibilidade de obter sêmen de touro infectado é mínima (Acha & Szyfres 1986, Campos et al. 2003, Paulin & Ferreira Neto 2003).

Nas propriedades classificadas como positivas, cabe ao sanitarista orientar no sentido de evitar a manutenção da brucelose nos rebanhos já infectados, pois se sabe que essa se deve, principalmente, às falhas de manejo, no que se refere aos cuidados no atendimento a partos distócicos, destino de restos de abortos e partos dos animais doentes (Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002).

## **5 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos, a brucelose é prevalente no estrato estudado e os principais fatores de risco que se associam à enfermidade — exploração de corte, raça Zebu e a presença de aborto — podem ser adequados para dirigir o programa de controle da enfermidade.

**Agradecimentos:** À equipe de médicos-veterinários, agentes agropecuários e secretárias dos escritórios locais da IAGRO dos vinte e dois municípios, que não mediram esforços no desempenho das atividades, durante a operacionalização dos trabalhos de campo.

## 6 REFERÊNCIAS

- Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington.
- Almeida R.F.C. 2001. Diagnóstico da brucelose e tuberculose bovina. Monografia de Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 30p.
- Brasil 2001. Instrução Normativa /SDA n. 2 de 10/1/2001. Diário Oficial da União, 4 jun. 2001. Seção1, 26-31. Secretaria de Defesa Animal, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. <http://www.agricultura.gov.br/das/dda/programa.html>.
- Brasil 2003. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 130p.
- Brautigam Rivera F.E. 1997. Notas de brucelose. Curso de Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Anais I Curso de Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária, Campo Grande, MS, 40p.
- Campaña R.C. Gotardo D.J. & Ishizuka, M.M. 2003. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo. [http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info\\_doc\\_bru1.htm](http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm).
- Campero C.M. 1993. Brucelosis en toros: una revisión. Vet. Med. 74:8-14.
- Campero C.M., Moore D.P., Odeon A.C., Cipolla A.L. & Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet. Res. Commun 27:259-269.
- Campos A.C.P., Freneau G.E., Acypreste C.S., Dias-Filho F.C., Bueno V.F.F., Souza J.P. & Resende L.C. 2003. Brucelose Bovina: Prevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em reprodutores bovinos na microrregião de Goiânia. Ciência Anim. Bras. 4 (2):125-129.



- Cavalléro J.C.M. 1998. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: Lemos, R.A.A. (ed.) Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 536p.
- Crawford P.R., Huber J.D. & Adams B.S. 1990. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K. & Duncan J.R. (ed.) Animal brucellosis. CRC Press, Boca Raton, USA. P.139- 141.
- Davies G. 1971. The rose bengal test. The Vet. Rec. 88(17): 447- 449.
- IAGRO 2003. Informe da campanha de vacinação contra a febre aftosa. Consolidado das regiões de Planalto e Pantanal, etapa novembro de 2003. Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- IBGE 2002. Resolução PR-051, de 31/7/89. Divisão de Pesquisa no Estado de Mato Grosso do Sul. Setor de documentação e disseminação de informações. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Campo grande, Mato Grosso do Sul.
- INDEA 2004. Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso. <http://www.indea.mt.gov.br/html/index.php>
- Luna-Martínez J.E. & Mejía-Terán C. 2002. Brucellosis in México: Current status and trends. Vet. Microbiol. 90: 19-30.
- Martin S.W., Meek A.H. & Willeberg P. 1987. Veterinary epidemiology: Principles and methods. Iowa State University Press. 343p.
- Martin S.W., Shoukri M. & Thorburn M.A.1992. Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. Prev. Vet. Med. 14: 33-43.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van Der Hoofd C.M. & Graaf E.A.M. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen. 445p.

- OIE 1987. Brucelosis bovina, ovina y caprina. Office International des Épizooties. Sér.Téc. 6: 282.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira. 1 ed. Funep, São Paulo, Brasil.. 154p.
- Pellegrin A.O., Leite R.M.H., Guimarães P.H.S., Lage A.P. & Leite R.C. 1999. Prevalência de brucelose bovina no Pantanal Matogrossense. Resumos 26º Congr. Bras. de Med. Vet. Campo Grande, CDRom.
- Poester F.P., Gonçalves V.S.P. & Lage A.P. 2002. Brucellosis in Brazil. Vet. Microb. 90: 55-62.
- Rosales J.F.M., Evangelista T.B.R., Bernal R.S. & Gómez M.F.M. 2002. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la brucelosis bovina em hatos lecheros de Tijuana, Baja Califórnia. Téc. Pecu. Méx. 40(3):243-249.
- Sampaio I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMVZ. 221p.
- Sanderson M.W., Dargatz D.A. & Garry F.B. 2000. Biosecurity practices of beef cow-calf procedures. JAVMA, 2:217.
- Thrusfield M. 1984. Veterinary epidemiology. 2 ed. London: Butterworth. 480p.
- Tocantins S. 2000. Distribuição espacial da brucelose no gado bovino no Pantanal de Mato Grosso e relação com fatores ambientais. Tese de Mestrado. Curso de Biologia (Ecologia). <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congresso/8-25.cintra.htm>.
- Vasconcellos S.A., Ito F.H. & Cortes J.A. 1987. Bases para prevenção da brucelose bovina. Comum.Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. da Univ. S.Paulo, São Paulo, 11: 25-36.

## 2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta soroprevalência da brucelose em rebanhos, no estrato pesquisado no Estado de MS, indica a ocorrência dessa doença de importância econômica e sanitária para o sistema de produção, além de representar um risco à saúde pública.

A distribuição do agente e a identificação dos fatores de risco associados são importantes para estabelecer programas de controle. A partir desse estudo, foi possível conhecer os fatores de risco associados à presença da brucelose, destacando os de maior relação positiva: exploração de corte, a raça Zebu e a ocorrência de aborto na propriedade. Embora apenas um estrato de MS tenha sido estudado, é possível sugerir que tais fatores poderão orientar as ações sanitárias para o controle da enfermidade.

Medidas profiláticas devem ser adotadas para controlar a infecção nas propriedades positivas. De início, os esforços dos órgãos de defesa devem ser dirigidos à educação sanitária, com os objetivos de esclarecer, informar, motivar os criadores para que adotem as medidas que são de sua competência, o que inclui: compra de animais com atestado negativo para brucelose, destino de fetos abortados e invólucros, limpeza e desinfecção de utensílios e instalações e a vacinação de bezerras de três a oito meses de idade. Essa prática tem benefício duplo, pois diminui a suscetibilidade do animal à infecção e a subsequente redução na prevalência dentro do rebanho e diminui o nível de exposição por redução do número de animais excretando *Brucella* (Crawford et al. 1990).

Em seguida devem ser preconizadas medidas relativas às fontes de infecção, quando os animais serão identificados por prova laboratorial e sacrifício até a obtenção de provas sorológicas sucessivas e negativas. As vias de eliminação de brucelas deverão ser combatidas com a incineração de fetos abortados e membranas fetais. As vias de transmissão, representadas pelo meio ambiente e seus componentes, deverão ser descontaminadas pela limpeza e desinfecção periódicas.

Quanto aos suscetíveis, inúmeros cuidados devem ser tomados: aquisição de animais, para reposição do plantel, de origem conhecida e com resultado negativo para brucelose; atendimento ao parto; vacinação de bezerras na idade recomendada; sorologia periódica para confirmação da situação de livre de brucelose; cuidados com o homem, que incluem desde o atendimento a partos até aqueles relacionados com a

manipulação de vacina B19, atenuada para bovinos, mas que retém a patogenicidade para o homem.

A presença da brucelose no rebanho leva à queda na produção animal e torna o produto da pecuária vulnerável a barreiras, diminuindo sua competitividade no comércio internacional. Em vista disso, o PNCEBT visa a melhorar a eficácia das medidas de combate à brucelose e à tuberculose, a fim de promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor e modernizar as cadeias produtivas do leite e da carne.

O PNCEBT, em MS, necessitará, em médio e longo prazos, de um sistema de controle e avaliação. Considera-se urgente completar o levantamento soroepidemiológico nos demais estratos, o que permitirá a avaliação comparativa entre a prevalência real obtida no Estado no início do saneamento e após a certificação de propriedades. Caso contrário, torna-se difícil o acompanhamento da evolução do programa de controle, pois mesmo que diminua o impacto da doença, não será possível quantificá-lo.

### **3 REFERÊNCIAS**

- Acha P.N. & Szyfres B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales, 2 ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington.
- Almeida R.F.C. 2001. Diagnóstico da brucelose e tuberculose bovina. Monografia de Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 30p.
- Almeida, L.P. de & Reis, D.O. 1999. Brucelose e bursite cervical em bovinos: Uma revisão. Rev. Bras. Med. Vet. 21(4).
- Alton G.G., Jones L.M. & Pietz D.E. 1976. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Serie Monografías, 55:55-133.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. & Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 190p.

- Alton G.G. & Forsyth J.R.L. 1996. In: Baron, Samuel (ed.). Medical microbiology. 4 ed. University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm>.
- Baumgarten D. 2002. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. Vet.Microbiol. 90: 63-69.
- Belchior A.P.C. 2000. Prevalência, distribuição regional e fatores de risco da tuberculose bovina em Minas Gerais. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 55p.
- Bishop G.C., Bosman P.P. & Herr S. 1994. Bovine brucellosis. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C. Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa. Oxford University Press, Cape Town 1:1054-1066.
- Blaha T. 1995. Epidemiología especial veterinaria. Ed. Acribia. 529p.
- Brandon M.R., Watson D.C. & Lascelles A.K. 1971. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. Aust. J. Biol. Sci. 49:613-623.
- Brasil 2001. Instrução Normativa /SDA n. 2, de 10/1/2001. Diário Oficial da União, 4 jun. 2001. Seção 1, 26-31. Secretaria de Defesa Animal. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. <http://www.agricultura.gov.br/das/dda/programa.html>.
- Brasil 2003. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose PNCEBT. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 130p.
- Brautigam Rivera F.E. 1997. Notas de brucelose. Curso de Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Anais I Curso de Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária, Campo Grande, MS, 40p.
- Campaña R.C., Gotardo D.J. & Ishizuka, M.M. 2003. Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina. Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo, [http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info\\_doc\\_bru1.htm](http://www.cda.sp.gov.br/DocEst/Docs/bru/info_doc_bru1.htm).

- Campero C.M. 1993. Brucelosis en toros: una revisión. Vet. Med. 74:8-14.
- Campero C.M., Moore D.P., Odeon A.C., Cipolla A.L. & Odriozola E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet. Res. Commun 27:259-269.
- Campos A.C.P., Freneau G.E., Acypreste C.S., Dias-Filho F.C., Bueno V.F.F., Souza J.P. & Resende L.C. 2003. Brucelose Bovina: Prevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em reprodutores bovinos na microrregião de Goiânia. Ciência Anim. Bras. 4(2):125-129.
- Cavalléro J.C.M. 1998. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: Lemos R.A.A.A. (ed.). Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul. Reconhecimento e diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 536p.
- Collins F.M. & Campbell S.G. 1982. Immunity to intracellular bacteria. Review. Vet. Immunol. Immunopathol. Jan. 3(1-2):5-66.
- Costa G.M., Abreu V.L.V., Lobato F.C.F., Silva J.A. & Martins N.E. 1999. Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo "O" no diagnóstico da brucelose bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 51(4).
- Crawford P.R., Huber J.D. & Adams B.S. 1990. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K. & Duncan J.R. (ed.) Animal brucellosis. CRC Press, Boca Raton, USA, 139- 141.
- Ferraz I.B.F. 1999. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. Rev. Bras. Repr. Anim. 22.4:504-508.
- Ficht T.A. 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Vet. Microbiol. Apr. 2, 92(3): 213-223.
- Frenchick P.J., Markham R.J. & Cochrane A.H. 1985. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 46(2): 332-335.

- Garin-Bastuji B., Hummela N., Gerbierb G., Caua C., Pouillotb R., Costa M. & Fontaine J. 1999. Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* O: 9. Vet. Microbiol. 66:223-233.
- Gorvel J.P. & Moreno E. 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90: 281-297.
- Guarino A., Serpe L., Fusgo G., Scaramuzzo A. & Gallo P. 2000. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. Vet. Rec. 147:634- 636.
- Huber J.D. & Nicoletti P. 1986. Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. Am. J. Vet. Res. 47, 7.
- INDEA 2004. Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso. <http://www.indea.mt.gov.br/html/index.php>.
- Ito F.H., Vasconcellos S.A., Bernardo F., Nascimento A.A., Labruna M.B. & Arantes I.G. 1998. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por ixodídeos em animais silvestres do Pantanal Sul-mato-grossense. Ars. Veterinária. 14 (3): 302-310.
- Kittelberg R., Bundesen P.G., Cloeckert A., Greiser-Wilke I. & Letesson J.J. 1998. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. Vet. Microbiol. Amsterdam, 60: 45-57.
- Kreutz L.C., Madruga C.R. & Araújo F.R. Imunidade contra bactérias 2001. In: Madruga C.R., Araújo F.R. & Soares C.O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. p.47-71.
- López-Merino A. 2004. Brucella. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microlibros/Cap.7/>.
- Luna-Martínez J.E. & Mejía-Terán C. 2002. Brucellosis in México: current status and trends. Vet. Microbiol. 90:19-30.

- MacMillan A. 1990. Conventional tests In: Nielsen K. & Duncan J.R. (ed.) Animal brucellosis. CRC Press, Boca Raton. p.153-197.
- Megid J., Ribeiro M.G., Marcos Junior G. & Crocci A.J. 2000. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 37 (5).
- Metcalf H.E., Luchsinger D.W. & Ray W.C. 1994 Brucellosis. In: Beran G.W. & Steele J.H.. (ed.). Handbook of Zoonoses. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic. 2 ed. CRC Press, Boca Raton. p. 9-39.
- Molnár L., Molnár E., Tury E. & Souza J.S. de 1997 Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. Rev. Bras. Med. Vet. 19 (4):157-162.
- Molnár E., Molnár L., Dias H.L.T., Souza J.S. & Vale W.G. 2000. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por testes sorológicos. Rev. Bras. Med. Vet. 22. (3):117-121.
- Moreno E. 2002. Brucellosis in Central America. Vet. Microbiol. 90:31-38.
- Nicoletti P. 2002. A short history of brucellosis. Vet. Microbiol. 90:5-9.
- Nielsen K. 1995. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. Arch. Med. Vet. 27:9-17.
- Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet. Microbiol. 90:447-459.
- Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van der Hoofd C.M. & Graaf E.A.M. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen. 445p.
- OIE. 1987. Brucelosis bovina, ovina y caprina. Office International des Épizooties. Sér. Téc. 6:282.
- Olascoaga R.C. 1976. Diagnostico sorologico de la brucelosis. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, Buenos Aires, 18 (3-4):107-41.



- OMS. 1986. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Organización Mundial de la Salud, Ginebra .Sér. Inf. Téc.740:149.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2002. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina Arq. Inst. Biol. São Paulo, São Paulo. 69, (2):105-112.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O combate à brucelose bovina. Situação brasileira, 1 ed. Funep, São Paulo, Brasil., 154p.
- Pellegrin A.O., Leite R.M.H., Guimarães P.H.S., Lage A.P. & Leite R.C. 1999. Prevalência de brucelose bovina no Pantanal Mato-grossense. Resumos 26<sup>o</sup> Congr. Bras. de Med. Vet., Campo Grande, CDRom.
- Poester F.P. 1997. Brucelose animal. Anais 2<sup>o</sup> Simpósio Pfizer sobre Doenças Infecciosas e Vacinas para Bovinos, Caxambu, Minas Gerais, p. 54-59.
- Poester F.P., Ramos E.T. & Thiesen S.V. 1998. Application of enzyme linked-immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul - Brasil. International Atomic Energy Agency, Vienna, IAEA-TECDOC-1055, p. 63-68.
- Poester F.P., Gonçalves, V.S.P. & Lage A.P. 2002. Brucellosis in Brazil. Vet. Microbiol. 90:55-62.
- Radostits O.M., Blood D.C. & Gay C.C. 2002. Veterinary Medicine. 9 ed. Baliere Tindall, London, 1737p.
- Ray W.C., Brown R.R., Stringfellow D.A., Schnurrenberger P.R., Scanlan C.M. & Swann A.I. 1988. Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 192:182-186.
- Samartino L.E., Gregoret R., Gall D. & Nielsen K .1999. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. J. Immunoassay. 20(3), 115-126.

- Samartino L.E., Buffoni L., Conde S. & Gregoret R. 2000. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Rev. Med. Vet. 82 (2):90-94.
- Samartino L.E. 2002. Brucellosis in Argentina Vet. Microbiol. 90:71-80.
- Samartino L.E., Salustio E. & Gregoret R. 2003. Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en hembras bovinas preñadas. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina, Rochas.
- Stemshorn B.W., Forbes L.B., Eaglesome M.D., Nielsen K.H., Robertson F.J. & Samagh B.S. 1985. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. Can. J. Comp. Med. Oct. 49(4):391- 4.
- Vasconcellos S.A., Ito F.H. & Cortes J.A. 1987. Bases para prevenção da brucelose bovina. Comunidade Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo. 11:25-36.
- Viana F.C., Moreira E.C., Silva J.A. & Rebelo R.M. 1981. Avaliação de testes sorológicos no diagnóstico de brucelose bovina crônica, Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, MG. 33(2): 277-285.

## APÊNDICES

## Questionário de Estudo Soroepidemiológico

## ***BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA***

## Estudo soroepidemiológico

<b>01-Identificação:</b> Município: _____ REGIÃO: _____ UF: _____ Proprietário: _____ Propriedade: _____ Código de cadastro no serviço de defesa: _____	<b>02 – Data da visita e colheita</b> _____/_____/_____ <b>03 – Código do rebanho no estudo (9 dígitos)</b> _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ <b>04 – Coordenadas</b> Lat _____° _____', Lon _____° _____', Altitude _____
---	--

**05- Tipo da Exploração:** ☐ corte ☐ leite ☐ mista

**06- Tipo de Criação:** ☐ confinado ☐ semi-confinado ☐ extensivo

**07- N° de Ordenhas por dia:** ☐ 1 ordenha ☐ 2 ou 3 ordenhas ☐ Não ordenha

**08- Tipo de Ordenha:** ☐ manual ☐ mecânica ao pé ☐ mecânica em sala de ordenha ☐ Não ordenha

**09- Produção de leite:** a) N° de vacas em lactação: \_\_\_\_\_  
b) Produção diária de leite na fazenda: \_\_\_\_\_ litros

**10- Usa inseminação artificial?** ☐ não ☐ usa inseminação artificial e touro ☐ usa só inseminação artificial

**11- Raça predominante - Bovinos:** ☐ zebu ☐ europeu de leite ☐ europeu de corte ☐ mestiço ☐ outras raças

- **Bubalinos:** ☐ murrh ☐ mediterrâneo ☐ carabao ☐ jaffarabadi ☐ outras raças

[illegible]

13- Outras espécies na propriedade: ☐ ovinos/caprinos ☐ equídeos ☐ suínos ☐ aves ☐ cão ☐ gato

14- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: ☐ não tem ☐ cervídeos ☐ capivaras ☐ outras:.....

15- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses? ☐ não ☐ sim ☐ não sabe

16- O que faz com o feto abortado e a placenta? ☐ enterra/joga em fossa/queima ☐ alimenta porco/cão ☐ não faz nada

17- Faz testes para diagnóstico de brucelose? ☐ não ☐ sim

Regularidade dos testes: ☐ uma vez ao ano ☐ duas vezes ao ano ☐ quando compra animais  
☐ quando há casos de aborto na fazenda ☐ quando exigido para trânsito/eventos/crédito

18- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução? ☐ não ☐ sim

Onde/de quem: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ de comerciante de gado ☐ diretamente de outras fazendas

19- Vende fêmeas ou machos para reprodução? ☐ não ☐ sim

A quem/onde: ☐ em exposição ☐ em leilão/feira ☐ a comerciante de gado ☐ diretamente a outras fazendas

20- Vacina contra brucelose? ☐ não ☐ sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade ☐ sim, fêmeas de qualquer idade

21- Local de abate das fêmeas e machos adultos no fim da vida reprodutiva:

☐ na própria fazenda ☐ em estabelecimento sem inspeção veterinária  
☐ em estabelecimento de abate com inspeção veterinária ☐ não abate

22- Aluga pastos em alguma época do ano? ☐ não ☐ sim

23- Tem pastos em comum com outras propriedades? ☐ não ☐ sim

24- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso? ☐ não ☐ sim

25- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto? ☐ não ☐ sim

26- A quem entrega leite? ☐ cooperativa ☐ laticínio ☐ direto ao consumidor ☐ não entrega

27- Resfriamento do leite: ☐ não faz ☐ faz Como: ☐ em resfriador ou tanque de expansão próprio  
☐ em resfriador ou tanque de expansão coletivo

28- A entrega do leite é feita a granel? ☐ não ☐ sim

29- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? ☐ não ☐ sim Finalidade: ☐ p/ consumo próprio ☐ p/ venda

30- Consome leite cru? ☐ não ☐ sim

31- Tem assistência veterinária? ☐ não ☐ sim De que tipo? ☐ veterinário da cooperativa ☐ veterinário particular

NOME DO VETERINÁRIO \_\_\_\_\_ ASSINATURA \_\_\_\_\_





Resultado do teste de triagem em animais, por município

Municípios	Amostras	AAT	
		Negativos	Positivos
Angélica	44	42	2
Bandeirantes	110	100	10
Caarapó	87	76	11
Campo Grande	206	173	33
Deodápolis	78	68	10
Douradina	20	17	3
Dourados	164	142	22
Fátima do Sul	36	35	1
Glória de Dourados	82	78	4
Itaporã	60	59	1
Ivinhema	134	123	11
Jaraguari	104	85	19
Jateí	76	64	12
Maracaju	140	132	8
Nova Alvorada do Sul	110	96	14
Novo Horizonte do Sul	125	115	10
Ribas do Rio Pardo	212	188	24
Rio Brilhante	80	75	5
Rochedo	78	68	10
Sidrolândia	235	202	33
Terenos	145	117	28
Vicentina	50	47	3
Totais	2.376	2.102	274

Tabela de tipos de criação, práticas de manejo e fatores de risco nos grupos de animais positivos, negativos e inconclusivos no teste do 2- MI

Exploração			Criação		Raça					Aborto			Vacinação		Diagóstico		Reprodução			Fonte de Contaminação		Compra de Animais		Consumo do Leite Cru		Assistência Veterinária	
Corte	Leite	Mista	Semi-confinado	Extensivo	Zebu	Europeu de Leite	Europeu de Corte	Mestiço	Outras Raças	Sim	Não	Não Sabe	Vacina	Não Vacina	Faz Teste	Não Faz Teste	Touro	Usa IA e Touro	IA	Existe Área Alagadiça	Não Existe Área Alagadiça	Sim	Não	Sim	Não	Possui	Não Possui
<b>Positivos n = 83</b>																											
40	25	18	1	82	42	8	4	29	0	33	48	2	68	15	30	53	72	9	2	62	21	41	42	11	72	36	47
48,2	30,1	21,7	1,2	98,8	50,6	9,6	4,8	34,9	0,0	39,8	57,8	2,4	81,9	18,1	36,1	63,9	86,7	10,8	2,4	74,7	25,3	49,4	50,6	13,3	86,7	43,4	56,6
		83		83,0					83,0			83,0		83,0		83,0			83,0		83,0		83,0		83,0		83,0
		100,0		100,0					100,0			100,0		100,0		100,0			100,0		100,0		100,0		100,0		100,0
<b>Negativos n = 123</b>																											
38	67	18	7	116	36	18	3	65	1	33	88	2	103	20	42	81	111	10	2	91	32	48	75	20	103	41	82
30,9	54,5	14,6	5,7	94,3	29,3	14,6	2,4	52,8	0,8	26,8	71,5	1,6	83,7	16,3	34,1	65,9	90,2	8,1	1,6	74,0	26,0	39,0	61,0	16,3	83,7	33,3	66,7
		123		123,0					123,0			123,0		123,0		123,0			123,0		123,0		123,0		123,0		123,0
		100,0		100,0					100,0			100,0		100,0		100,0			100,0		100,0		100,0		100,0		100,0
<b>Inconclusivos n = 4</b>																											
4	0	0	0	4	3	0	1	0	0	3	1	0	4	0	2	2	4	0	0	3	1	1	3	0	4	3	1
100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	75,0	0,0	25,0	0,0	0,0	75,0	25,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0	100,0	0,0	0,0	75,0	25,0	25,0	75,0	0,0	100,0	75,0	25,0
		4		4,0					4,0			4,0		4,0		4,0			4,0		4,0				4,0		4,0
		100,0		100,0					100,0			100,0		100,0		100,0			100,0		100,0				100,0		100,0
<b>Totais n = 210</b>																											
82	92	36	8	202	81	26	8	94	1	69	137	4	175	35	74	136	187	19	4	156	54	90	120	31	179	80	130
39,0	43,8	17,1	3,8	96,2	38,6	12,4	3,8	44,8	0,5	32,9	65,2	1,9	83,3	16,7	35,2	64,8	89,0	9,0	1,9	74,3	25,7	42,86	57,143	14,8	85,2	38,1	61,9
		210		210,0					210,0			210,0		210,0		210,0			210,0		210,0		210		210,0		210,0
		100,0		100,0					100,0			100,0		100,0		100,0			100,0		100,0		100		100,0		100,0