

**Francisco Feliciano da Silva Júnior**

**Avaliação do Teste do Anel na Vigilância Epidemiológica da  
Brucelose Bovina em Rebanhos e Laticínios**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Vigilância Sanitária.

**Botucatu – SP**

**2003**

**Francisco Feliciano da Silva Júnior**

**Avaliação do Teste do Anel na Vigilância Epidemiológica da  
Brucelose Bovina em Rebanhos e Laticínios**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Vigilância Sanitária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jane Megid.

Co-orientador: Prof. Dr. José Paes de A. N. Pinto.

**Botucatu – SP**

**2003**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Silva Junior, Francisco Feliciano.

Avaliação do Teste do Anel na vigilância epidemiológica da  
brucelose bovina em rebanhos e laticínios /  
Francisco Feliciano da Silva Júnior. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Jane Megid

Assunto CAPES: 40602001

1. Brucelose em bovino

CDD 636.20896959

Palavras-chave: Diagnóstico; Bovinos; Brucelose; Leite; Teste do Anel;  
Sorologia

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Francisco Feliciano da Silva** e **Delzuita Gomes de Oliveira Feliciano** por tudo de bom que sempre me deram e que eu nunca saberei retribuir à altura, porque sou muito pequeno diante de sua grandeza. E por mais que eu busque palavras para, ao mesmo, registrar minha gratidão por seu amor e dedicação, nada que eu escreva será suficiente para expressar o que deveras sinto.

Aos meus irmãos **Fábio Denílson de Oliveira Feliciano** e **Daniele de Oliveira Feliciano** que mesmo a distância sei que estavam torcendo pelo meu sucesso desde o início desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por além de me ajudar em todos os momentos, como sempre faz, deu-me forças para que eu não me desanimasse diante dos percalços que enfrentei para chegar até aqui.

A **Profa. Jane Megid**, minha orientadora, que me concedeu o privilégio de te-la como minha orientadora, agradeço por sua dedicação, seu interesse e o esforço por ver essa jornada concluída. Minha estima e eterna gratidão.

Ao **Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto**, meu co-orientador, que não mediu esforços para apoiar-me nos momentos cruciais desta jornada.

Aos Professores **Márcio Garcia Ribeiro** e **Paulo Francisco Domingues** pelos esclarecimentos e auxílio neste trabalho. Muito obrigado, pelo ensino e incentivos recebidos.

Ao **Prof. Adalberto José Croci**, pela realização das análises estatísticas.

Aos colegas de mestrado **Cristiane Nakada Nozaki**, **Carla Moraes**, **Keila Lima** obrigado pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos **Rafael de Oliveira Guena** e **Simone Rigatto Brollo**, pela sincera amizade, atenção, colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da área de enfermidades infecciosas dos animais domésticos: **Fernando**, **Humberto**, **Nilson** e **Rodrigo**, muito obrigado.

Ao amigo **José Eduardo Bosco**, Médico Veterinário, pelo apoio nos momentos de dificuldade. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Médico Veterinário **Geraldo** pelo auxílio na colheita do material.

À **Denise e Maria**, setor de pós-graduação, pela colaboração e incentivo.

Ao laticínio Gêgê, pelo auxílio na colheita do leite em sua plataforma e por facilitar o contato com os produtores.

Aos funcionários da biblioteca da UNESP – Botucatu.

Agradeço a todos os proprietários das fazendas que permitiram a participação de seus animais, contribuindo desta forma para a sua realização deste trabalho.

**SUMÁRIO**

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
| 1 – INTRODUÇÃO                                    | Pág. 11 |
| 2 – REVISÃO DE LITERATURA                         | Pág. 13 |
| 3 – OBJETIVOS                                     | Pág. 20 |
| 4 – MATERIAL E MÉTODOS                            | Pág. 21 |
| 4.1 – População Estudada                          | Pág. 21 |
| 4.2 – Colheita das Amostras                       | Pág. 21 |
| 4.2.1 – Leite                                     | Pág. 21 |
| 4.2.1.1 – Amostra Individual dos Animais          | Pág. 21 |
| 4.2.1.2 – Amostras dos Latões                     | Pág. 22 |
| 4.2.2 – Sangue                                    | Pág. 22 |
| 4.3 – Local de Processamento das Amostras         | Pág. 22 |
| 4.4 – Antígenos                                   | Pág. 23 |
| 4.5 – Métodos                                     | Pág. 23 |
| 4.5.1 – Provas realizadas no leite                | Pág. 23 |
| 4.5.1.1 – Califórnia Mastitis Test                | Pág. 23 |
| 4.5.1.2 – Teste do Anel                           | Pág. 23 |
| 4.5.1.2.1 – Modificação no Teste do Anel          | Pág. 24 |
| 4.5.2 – Provas Sorológicas                        | Pág. 24 |
| 4.5.2.1 – Prova do Antígeno Tamponado Acidificado | Pág. 24 |
| 4.5.2.2 – Soroaglutinação lenta em tubos          | Pág. 25 |
| 4.5.2.3 – 2-Mercaptoetanol                        | Pág. 26 |
| 4.6 – Aplicação do Questionário Epidemiológico    | Pág. 26 |
| 4.7 – Análise Estatística                         | Pág. 27 |
| 5 – RESULTADOS                                    | Pág. 28 |
| 5.1 – Califórnia Mastitis Test                    | Pág. 28 |
| 5.2 – Sorológicos                                 | Pág. 28 |
| 5.3 – Teste do Anel                               | Pág. 29 |
| 5.3.1 – Teste do Anel Individual                  | Pág. 29 |
| 5.3.2 – Teste do Anel em Latões                   | Pág. 30 |
| 5.3.3 – Resultado na Modificação no Teste do Anel | Pág. 31 |

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| 5.4 – Inquérito Epidemiológico          | Pág. 32 |
| 5.4.1 – Composição do rebanho           | Pág. 32 |
| 5.4.2 – Regime de Criação               | Pág. 32 |
| 5.4.3 – Aquisição dos Animais           | Pág. 32 |
| 5.4.4 – Características dos Animais     | Pág. 33 |
| 5.4.5 – Performance Sanitária           | Pág. 33 |
| 5.5 – Produção de leite por propriedade | Pág. 34 |
| 6 – DISCUSSÃO                           | Pág. 35 |
| 7 – CONCLUSÕES                          | Pág. 39 |
| 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS          | Pág. 40 |
| 9 – ANEXO                               | Pág. 47 |

SILVA JÚNIOR, F.F. Avaliação do Teste do Anel na Vigilância Epidemiológica da Brucelose Bovina em Rebanhos e Laticínios, Botucatu, 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

A brucelose bovina é uma zoonose de ampla distribuição, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de se constituir em um sério problema de saúde pública. Este trabalho teve por objetivo avaliar a prova do Teste do Anel (TAL) para diagnóstico da Brucelose bovina em amostras de leite, visando o diagnóstico individual e de rebanho. Foram avaliadas 464 amostras individuais de leite de fêmeas bovinas em diferentes períodos de lactação e 54 amostras de leite dos latões constituídos por leite dos respectivos animais. Os resultados obtidos foram avaliados frente aos resultados sorológicos das provas do Antígeno Tamponado Acidificado (ATA) e Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL)/2-Mercaptoetanol (2-ME). Das 464 amostras individuais de leite analisadas frente ao TAL, 123 (26,50%) apresentaram resultados positivos. Dentre estas, 31 (25,20%) resultaram positivas ao ATA, 28 (22,76%) ao ATA/SAL/2-ME e 18 (14,63%) à SAL. Das 341 amostras negativas ao TAL pertenciam a animais sorologicamente positivos ao 2-ME, caracterizando 77,23% das reações falso-positivas e 1,2% de reações falso-negativas no TAL individual. Das 54 amostras de leite de latões analisadas pelo TAL, 16 (29,63%) resultaram positivas ao TAL. Entretanto, possuíam leite de animais sorologicamente positivos pelo 2-ME; 1 (1,85%) resultou positivo ao TAL, entretanto, todos os animais que o compunham resultaram negativos ao 2-ME, caracterizando falso-positivo; 3 (5,56%) latões foram classificados como TAL negativos, porém, possuíam leite de animais positivos ao 2-ME caracterizando falso-negativos. O TAL individual demonstrou elevado percentual de resultados falso-positivos, enquanto que o TAL em latões detectou 84,2% dos latões contaminados e 75% das propriedades infectadas,

demonstrando ser uma ferramenta útil na vigilância epidemiológica da Brucelose bovina.

Palavras-chave: Diagnóstico; Bovinos; Brucelose; Leite; Teste do Anel; Sorologia.

SILVA JÚNIOR, F. F. Evaluation of Ring Test as a tool of epidemiological vigilance to Bovine Brucellosis in herds and milkery, Botucatu, 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **ABSTRACT**

Bovine brucellosis is a zoonosis of wide distribution, responsible of great economical loses, even being a serious public health problem. The subject of this work is was to evaluate the Ring Test (RT) for bovine brucellosis in milk samples, looking for an individual and a herd diagnostic test. Individual samples of milk from 464 bovine females were evaluated as well 54 samples of bulk's milk with milk production of respective animals. The results were evaluated comparatively to individual serological results to Rose Bengal (RBT), Tube Agglutination (TAT) and 2-Mercaptoethanol (2-ME) tests. From the 464 individual samples the individual RT, shows 123 (26,50%) positive results, in that 31 (25,20%) resulted positive for the RBT and 28 (22,76%) for RBT/TAT/2-ME and 18 (14,63%) TAT. From 341 negative samples to RT were from TAT/2-ME positive serological animals showing 77,23% of positive false reaction and 1,2% of negative false reaction for the individual RT. From 54 samples of bulk's milk 16 (29,63%) RT positive results have milk from positive serological animals for TAT/2-ME, 1 (1,85%) positive to RT, although, all of the animals were serologically negative to TAT/2-ME, characterizing false positive reaction and 3 (5,56%) bulk's were classified as negative to RT, although have milk from positive animals to TAT/2-ME characterizing false negative result. The individual RT showed high percentage of false positive results, while RT in the bulk presented low percentage of false positive reactions, detecting 84,2% of contaminated bulk's and 75% of infected properties, demonstrating to be a important tool for bovine brucellosis epidemiological vigilance.

Keywords: Diagnosis; Bovines; Brucellosis; Milk; Ring Test; Serology

## 1 – INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é um dos principais ramos da pecuária nacional destacando-se pela sua importância econômica e gerando empregos diretos e indiretamente ao setor agrícola. De acordo com o Ministério da Agricultura, as leiteiras respondem por 20% do total das propriedades de bovinos no Brasil (BRASIL, 2001). Atualmente, a produção nacional de leite está estimada em 21.063 bilhões de litros; destes, 69% da produção está concentrada na região sudeste e sul (LEITE BRASIL, 2002).

FONSECA E SANTOS (2001) analisaram a evolução do setor leiteiro dentro de uma macro perspectiva e comentaram que grandes avanços foram obtidos pela pecuária leiteira brasileira nos últimos anos. Dentre estes avanços pode-se destacar o crescimento sistemático e constante, por três décadas, da produção nacional com taxas próximas a 4% ao ano, uma das mais altas no mundo. Porém, de acordo com XAVIER (1999), apesar dos avanços demonstrarem a grande potencialidade do setor leiteiro brasileiro, 95% do leite nacional é do tipo C, evidenciando um dos problemas que necessitam serem sanados para que se possa melhorar a qualidade do leite nacional.

Outro grande problema a ser enfrentado é o controle de determinadas enfermidades infecciosas de caráter zoonótico, transmitidas ao homem pelo leite cru e seus derivados. Dentre estas enfermidades, destaca-se a brucelose que ocorre, endemicamente, em todo o território nacional (SOUZA et al., 1977; BRASIL, 1991).

A brucelose bovina é uma doença infecciosa de origem bacteriana causada, normalmente, pela *Brucella abortus* que se caracteriza por abortamentos nos estágios finais da gestação e, subsequente, por alta taxa de infertilidade (ALTON et al., 1976). Os prejuízos econômicos são evidenciados pela queda na produção de leite e carne e redução da fertilidade, traduzida pelo aumento significativo do número de vacas estéreis, com conseqüente declínio da taxa de natalidade (OLASCOAGA, 1976).

Pelo seu caráter zoonótico, torna-se de primordial importância a identificação e eliminação das fontes de infecção com a finalidade de bloquear a

transmissão ao ser humano e a outros animais susceptíveis (NIELSEN et al., 1990).

Dado o impacto econômico na saúde animal e o risco de infecção da população humana, diversos países têm aplicado recursos substanciais para o diagnóstico, controle e erradicação da brucelose (ROXO, 2000). Em 2001, no Brasil, foi lançado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que tem como objetivo diminuir a prevalência e a incidência destas enfermidades. No que se refere à brucelose bovina e bubalina, o regulamento do PNCEBT preconiza a vacinação das fêmeas de 3 a 8 meses de idade e diagnóstico indireto dos animais, utilizando, para isto, as provas do antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento para diagnóstico sorológico e o teste do anel em leite para o monitoramento de estabelecimentos certificados como livres de brucelose (BRASIL, 2001).

A aplicação dos testes diagnósticos em nível de rebanho e laticínios fornece o diagnóstico da situação e permite que medidas de controle eficazes sejam adotadas.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose bovina é uma zoonose de ampla distribuição, responsável por consideráveis perdas econômicas (XOLALLPA CAMPOS et al., 1993; FERRAZ, 1999), além de se constituir em um sério problema de saúde pública (ORTOLANI et al., 1987; SAMARA et al., 1996).

A enfermidade é causada por microrganismos do gênero *Brucella*, cocobacilos Gram-negativos, pequenos, aeróbios, imóveis, não-capsulados, de multiplicação lenta e que não formam esporos (SALATA, 1997). Atualmente, são reconhecidas seis espécies do gênero *Brucella* que são: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* e *B. canis* (LOPEZ et al., 1998), além de novas espécies em animais marinhos classificadas, previamente, como *B. cetaceae* e *B. pinnipediae* (FOSTER et al., 2002). Estas espécies mostram preferências por diferentes hospedeiros, mesmo exibindo 98% de homologia em seu DNA (FERRAZ, 1999). Segundo OLASCOAGA (1976), as brucelas não são espécie-específicas, mas têm eletividade por espécie. Nos bovinos, por exemplo, a brucelose resulta, principalmente, da infecção por *Brucella abortus* (TOBIAS et al., 1992; PALMER et al., 1997; LORD et al., 1998); no entanto, esses animais também podem ser infectados por *B. melitensis* e *B. suis*, sendo, em algumas regiões, a enfermidade por estas espécies responsáveis pela doença em bovinos (CORBEL, 1999).

A enfermidade tem distribuição mundial (FERRAZ, 1999), exceto nos países que a erradicaram, através de trabalhos sistemáticos, como é o caso do Japão e muitos países da Europa. Outros países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América e a França, mantêm esta enfermidade controlada (MOLNÁR et al., 1997), e vem sendo observada a reemergência da doença em locais anteriormente controlados como Malta e Omã (CORBEL, 1999).

No Brasil, a brucelose bovina ocorre, endemicamente, em todo o território nacional, podendo ser diagnosticada em qualquer rebanho, independentemente, de forma de criação e exploração econômica a que esteja submetido (BRASIL, 1991).

De forma geral na América Latina, as perdas econômicas devido à brucelose são estimadas em US\$ 600 milhões ao ano (XOLALLPA CAMPOS et al., 1993).

Para FARIA (1984), tais perdas devem-se à diminuição da produtividade no rebanho bovino, evidenciada por redução na produção láctea de 20 a 25%, diminuição de produção cárnea de 10 a 15%, perda de bezerros ocasionadas por abortamento em 15%. Adicionalmente, uma em cada cinco vacas torna-se estéril e, nas fêmeas férteis, observa-se um aumento de, aproximadamente, 255 dias no intervalo entre partos.

A brucelose é classificada como uma enfermidade ocupacional de trabalhadores pecuários, açougueiros, magarefes e Médicos Veterinários (SOUZA et al., 1977).

COELHO et al. (1995) detectaram um coeficiente de prevalência de 2,17% em trabalhadores de matadouro industrial, comprovando a sua importância em grupos ocupacionais.

Além do seu aspecto ocupacional, o homem se infecta naturalmente com produtos alimentícios elaborados com leite cru de animais infectados (SOUZA et al., 1977; CORBEL, 1999). Segundo MARTINS (1994), em músculos, as *Brucella* podem manter-se viáveis durante meses, por serem pouco afetadas pela acidificação, sobretudo quando as carcaças ou cortes são conservados à temperatura de refrigeração ou congelamento, sobrevivendo igualmente à salmoura e à salga.

A infecção natural pela *Brucella* ocorre através da penetração do agente na mucosa conjuntival, nasal, ou oral (FERRAZ, 1999), sendo esta última a principal porta de entrada (BARR e ANDERSON, 1993; XOLALLPA CAMPOS et al., 1993). Em seguida, a bactéria é transportada livre ou dentro de células fagocíticas para os linfonodos regionais, onde ocorre a hiperplasia e inflamação. A infecção é, então, disseminada a outros linfonodos, baço e fígado. A sobrevivência no interior dos macrófagos permite a esta bactéria escapar de mecanismos extras celulares de defesa do hospedeiro, como ativação do complemento e anticorpos,

tornando-se, assim, uma importante base para o estabelecimento da infecção crônica (OLIVEIRA e SPLITTER, 1996).

Os bovinos se infectam ingerindo a *Brucella abortus* (*B. abortus*) na pastagem, na água e alimentos contaminados, ou lambendo fetos abortados, secundinas ou exsudato genital proveniente de fêmeas infectadas que abortaram ou pariram recentemente (OLASCOAGA 1976). A transmissão venérea por touros infectados às fêmeas suscetíveis, através da monta natural, pode ocorrer mas é rara. Vacas podem se infectar através da inseminação artificial, quando o sêmen contaminado por *Brucella* é depositado no útero, mas não quando é depositado na porção média da cérvix (FRASER, 1991).

Os bovinos, raramente, desenvolvem a doença na puberdade e podem permanecer como portadores sãos até a idade adulta, quando tendem a apresentar sintomatologia clínica e lesões (TEIXEIRA et al., 1998). Nas fêmeas bovinas, a sintomatologia clínica é restrita ao abortamento, neonatos enfermos, redução da produção de leite e carne, lesões uterinas de caráter inflamatório ou necrótico e, nos machos, observa-se orquite e/ou epididimite (FRASER, 1991; MOLNÁR et al., 1997).

A infecção por *Brucella* induz nos animais susceptíveis resposta imune de natureza humoral e celular (SUTHERLAND, 1980). Nos bovinos, a resposta imune humoral é, geralmente, similar à que ocorre em outras espécies animais, caracterizando-se pela formação de Imunoglobulinas (Ig), que exercem suas atividades no soro e secreções dos animais (BUTLER e MAXWELL, 1971).

Um dos pilares nos quais se baseiam as campanhas sanitárias destinadas à erradicação ou diminuição das taxas de ocorrência da brucelose, consiste na disponibilidade de métodos de diagnóstico que sejam, ao mesmo tempo, confiáveis e de execução relativamente simples (MATHIAS e MACMILLAN, 1995).

Segundo TEIXEIRA et al. (1998), o diagnóstico pode ser realizado clínica ou laboratorialmente para a detecção da doença no homem e em animais. De acordo com CAMPERO (1993), ele pode ser realizado pelo isolamento da *Brucella* em hemoculturas, punção de lesões, sorologia (detecção e quantificação de anticorpos anti-*Brucella* circulantes) e aglutinação do plasma seminal.

Na atualidade, somente é possível dizer que uma enfermidade infecciosa é diagnosticada, com segurança, depois do isolamento e identificação do agente. Porém, no caso de muitas dessas enfermidades, isso é um processo lento e muito oneroso, principalmente em medicina veterinária, pois é freqüente a necessidade de investigar muitos animais em programas de vigilância. A *Brucella* é tipicamente, uma enfermidade complexa, exigindo tempo para o isolamento e identificação do agente (7 a 14 dias), além de ser um procedimento de risco, por se tratar de uma zoonose (MOLNÁR et al., 1997).

Devido às limitações dos procedimentos laboratoriais que se apóiam nos cultivos, os métodos sorológicos têm sido os mais utilizados para o diagnóstico da brucelose (PIETZ e COMART, 1980; SUTHERLAND, 1980; MOLNÁR et al., 1997).

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural estimula o aparecimento simultâneo ou ligeiramente diferenciado de IgM e IgG. Durante a evolução da doença, há declínio e tendência do desaparecimento dos níveis de IgM, enquanto que a IgG persiste em níveis elevados. O desaparecimento de IgG significa, geralmente, eliminação da infecção (OLASCOAGA, 1976).

SUTHERLAND (1980) comenta que em bovinos imunizados com a vacina amostra B19, a classe IgM apresenta concentrações máximas por volta do 13º dia após a vacinação, enquanto que a IgG1 é detectada em pequenas quantidades, com picos máximos entre o 28º e o 42º dia pós-vacinal desaparecendo, no entanto, 24 meses após a vacinação.

Numerosos são os métodos utilizados no sorodiagnóstico da brucelose, sendo que os mesmos variam em sensibilidade e especificidade (MacMILLAN, 1990). Dentre estes, são relatados em soro sangüíneo as provas de soroaglutinação rápida em placa (SAR), soroaglutinação lenta em tubo (SAL), antígeno acidificado tamponado corado com rosa bengala (ATA), Rivanol (R), Coombs (Coombs), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC) (MORGAN, 1967; ALTON et al., 1976, OLASCOAGA, 1976; SUTHERLAND, 1980). O programa de controle nacional da brucelose e tuberculose bovina instituído no Brasil em 2001 preconiza a utilização da prova do antígeno

acidificado tamponado (ATA) como método de triagem para brucelose, tendo como método confirmatório o 2-ME e FC (BRASIL, 2001).

Além do sangue, também se pode utilizar o leite para a detecção de animais brucélicos. Nesse caso, o teste mais utilizado é o Ring Test (RT) ou teste do anel em leite (TAL), considerado um método satisfatório e de baixo custo para o monitoramento de rebanhos leiteiros (NIELSEN et al., 1988). Este teste é especialmente indicado como método diagnóstico presuntivo destinado a identificar rebanhos infectados em áreas de controle da brucelose (OLASCOAGA, 1976; TOMÉ e SAMARTINO, 1997), sendo, no Brasil, preconizado para monitoramento de rebanhos certificados como livres da enfermidade (BRASIL, 2001).

De acordo com SUTRA et al. (1986), DIAS e BLASCO (1994) citado por LOPEZ et al., (1998), todas as classes e subclasses de imunoglobulinas no leite (IgA, IgM, IgG1 e IgG2) podem ser responsáveis por resultados positivos no TAL porém, a presença de IgA em reações positivas, isoladamente ou não, indica que ela é a principal classe envolvida na reação, juntamente com a IgM.

As vantagens do TAL têm sido citadas por ROEPKE e STILES (1970), ALTON et al. (1976), SUTHERLAND (1980) e GARCIA-CARRILO (1982). Entre as principais, citam a praticidade, segurança, simplicidade e utilidade na profilaxia da brucelose bovina pois, além de sensibilidade adequada, é uma prova coletiva que permite diagnosticar brucelose em rebanhos para, posteriormente, realizar uma investigação individual.

Segundo os mesmos autores, as principais desvantagens inerentes ao TAL são a utilização exclusiva em animais em lactação, resultados falsos positivos em leite procedente de animais vacinados com idade superior à indicada para a vacina B<sub>19</sub>, em início da lactação, devido à presença de colostro, assim como em casos de mastite. Adicionalmente, fatores como alto conteúdo de gordura e condições ambientais inadequadas podem levar a resultados falso-positivos no TAL (ACEDO et al., 1997; OLASCOAGA, 1976; NICOLETTI, 1994).

O TAL apresenta, também, como fatores limitantes, a diluição dos anticorpos presentes no leite que ocorre em rebanhos leiteiros com grande

quantidade de leite armazenado nos tanques de recolhimento (OLASCOAGA, 1976; NICOLETTI, 1994).

A aplicação freqüente do TAL em um rebanho permite a detecção de infecções precoces, aumenta a eficiência do teste e possibilita a prevenção de surtos em rebanhos suscetíveis. Atualmente, algumas agências de fiscalização exigem a execução do teste pelo menos três vezes ao ano (RADOSTITIS et al., 1995).

MORGAN (1967), em uma revisão sobre o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, relata que experiências demonstraram que séries de três ou quatro testes, anualmente, realizadas com TAL detectaram 85% de rebanhos infectados que continham 95% de animais sorologicamente positivos, e que 97% de rebanhos com três resultados consecutivos negativos no TAL resultaram negativos a testes sorológicos.

Este mesmo autor relata que a probabilidade de obter resultados positivos no TAL para “pool” de leite de 25 animais é de 96% quando existem dois reagentes e de 99% para 3 reatores. Ressalta, porém, a necessidade de avaliação do teste para latões de leite de até 50 animais (MORGAN, 1967), concordante com o Escritório Internacional de Epizootias (OIE, 2000) que considera o TAL efetivo para separar e monitorar bovinos leiteiros com brucelose, entretanto, sem segurança em rebanhos superiores a 100 cabeças.

TOMÉ e SAMARTINO (1997) consideraram que a eficácia do TAL para detectar animais ou rebanhos infectados por brucelose é variável. Depende de fatores como a eliminação ou não de anticorpos brucélicos pelo leite, o tamanho do rebanho em ordenha, a quantidade de leite produzida pelas vacas infectadas, frente à produtividade de todas as vacas em lactação, e a freqüência com que se realiza o controle no rebanho. Mediante isto, concluíram que o TAL não é o procedimento mais satisfatório para detectar fêmeas bovinas ou rebanhos infectados. Porém, sua utilização é considerada, pelos autores, muito útil na vigilância epidemiológica das áreas livres, nos rebanhos declarados oficialmente livres e no diagnóstico presuntivo dos rebanhos nas zonas de controle da brucelose.

CHIELLE et al. (1989) aplicaram o TAL em 503 amostras de leite, obtendo 122 positivos (24,26%), mas só 0,4% pertenciam a animais sorologicamente positivos pelo 2-ME. Os autores concluíram que as causas mais prováveis de resultados falsos-positivos seriam a presença de leucócitos e células de descamação da glândula mamária presentes no leite.

Em uma investigação da brucelose bovina no Irã, ZOGHI et al. (1992) coletaram, simultaneamente, amostras de leite e soro de 6472 vacas e avaliaram-nas frente ao TAL, ATA, SAL, 2-ME e FC, resultando 1632 amostras de leite positivas ao TAL e 1956 animais sorologicamente positivos, detectando 83,4% dos animais sorologicamente positivos.

HUBER e NICOLETTI (1986) avaliaram o TAL em 1003 amostras individuais de leite de vacas, comparando seus resultados aos do ATA, Rivanol, FC, e constataram especificidade de 57,5% no TAL.

A seleção de provas sorológicas em programas de controle, erradicação ou estudo de prevalência da brucelose, é bastante diversificada. OLASCOAGA (1976) comenta que a definição dos métodos mais adequados nos programas de controle e erradicação deve ser estabelecida de acordo com a espécie a ser trabalhada, a prevalência esperada e o programa de vacinação que está sendo adotado na região. Adicionalmente, existem diferenças importantes na capacidade de cada teste, no que diz respeito a sua sensibilidade e especificidade. Uma prova pode se apresentar muito sensível, entretanto pouco específica, enquanto outra pode ser exatamente o inverso. Atualmente não existe um teste sorológico perfeito (MOLNÁR et al., 1997).

Tendo em vista que o TAL é preconizado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose para monitoramento de rebanhos leiteiros certificados como livres e que apresenta alguns fatores limitantes como já supra citado, torna-se importante avaliar a utilização do mesmo como ferramenta de vigilância epidemiológica da brucelose bovina. Desta forma, pretende-se avaliar a eficácia diagnóstica do TAL em amostras individuais de leite e em amostras de latões, frente aos resultados sorológicos obtidos nos animais avaliados.

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – GERAL

- Avaliar o Teste do Anel como ferramenta de vigilância epidemiológica.

#### 3.2 – ESPECÍFICOS

- Avaliar o Teste do Anel em amostras individuais de leite;
- Avaliar o Teste do Anel em amostras de latões no laticínio.

## **4 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1– População Estudada**

Foram estudadas 464 amostras individuais de leite e de soro sanguíneo de fêmeas bovinas em diferentes períodos de lactação, com idade variando de 2 a 12 anos (ANEXO 01), provenientes de 13 propriedades do interior do Estado de São Paulo localizadas nos municípios de Botucatu, Pardinho e Pereiras. Foram, também, estudadas 54 amostras de leite dos latões constituídos por leite dos respectivos animais.

O tamanho amostral foi calculado considerando um limite de confiança de 95% e um erro de estimativa de prevalência de 5% (ZAR, 1996).

### **4.2 – Colheita das Amostras**

#### **4.2.1 – Leite**

##### **4.2.1.1 – Amostra Individual dos Animais**

Após a anti-sepsia dos quartos do animal, seguindo manejo preconizado pela propriedade, foram desprezados os três primeiros jatos de leite de cada quarto. Em seguida, foram colhidas, através da ordenha manual, amostras individuais de cada teto ( $\pm 10\text{mL}$ ) em tubos de ensaio plásticos estéreis. Os materiais foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo reciclável e encaminhados ao laboratório para realização do CMT x TAL. Todos os leites dos quartos foram analisados individualmente frente ao CMT e o TAL foi realizado apenas em um dos quartos sendo, para tal, realizado o sorteio do mesmo de forma casual.

#### **4.2.1.2 – Amostras dos Latões**

Os latões utilizados no acondicionamento do leite para posterior envio ao laticínio, foram identificados na propriedade, sendo determinados os animais e a produção leiteira em média que corresponderam a cada latão. No laticínio, foram coletadas, com o auxílio de uma pipeta estéril, amostras de leite ( $\pm 10\text{mL}$ ) dos latões previamente identificados na propriedade.

#### **4.2.2 – Sangue**

As amostras de sangue de todos os animais, dos quais coletou-se o leite, foram obtidas, através de venopunção da mamária, utilizando-se agulhas descartáveis calibre 40 x 16 mm, após prévia anti-sepsia com álcool-iodado a 2,5% da região. O volume de sangue obtido ( $\pm 6\text{mL}$ ) foi coletado em tubos de ensaio de 10ml que permaneceram inclinados para facilitar o processo de retração do coágulo visando a obtenção do soro para realização dos testes sorológicos. As amostras de sangue foram centrifugadas a 800g durante 8 minutos e os soros foram transferidos para ependorfes estéreis, que foram mantidos congelados, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até a realização dos testes sorológicos. No momento da realização das provas sorológicas, as amostras foram descongeladas e mantidas à temperatura ambiente.

#### **4.3 – Local de Processamento das Amostras**

As amostras de leite e sangue foram processadas no laboratório de Imunologia Aplicada às Enfermidades Infecciosas Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

#### **4.4 – Antígenos**

Para a realização do TAL e das provas sorológicas, foram utilizados antígenos produzidos e distribuídos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e adquiridos junto ao Escritório de Defesa Agropecuária na cidade de Botucatu-SP.

#### **4.5 – Métodos**

##### **4.5.1 – Provas realizadas no leite**

##### **4.5.1.1 – Califórnia Mastitis Test (CMT)**

O CMT foi realizado de acordo com a técnica descrita por SCHALM e NOORLANDER (1957), utilizando-se o reagente químico para diagnóstico da mastite bovina (CMT-FATEC\*).

Para 2mL de leite coletados, adicionaram-se 2mL de reagente CMT-FATEC. Em seguida procedeu-se à agitação, vagarosa, por 1 a 2 minutos, observando-se o grau de coagulação e coloração. Os resultados foram classificados em cruces, de acordo com o protocolo do fabricante, variando de negativo para leite sem precipitação até 3 cruces para leite completamente coagulado ou gelatinoso.

##### **4.5.1.2 – Teste do Anel (TAL)**

O TAL foi realizado de acordo com a técnica descrita por GARCIA-CARRILO (1982), modificado com base na metodologia descrita por ROEPKE e STILES (1970) e informações do TECPAR. Desta forma, os leites coletados na propriedade e no laticínio foram mantidos em refrigeração por, aproximadamente, 6 horas, período relacionado ao transporte e, imediatamente, processados ao chegarem ao laboratório.

\* CMT-FATEC (CALIFORNIA MASTITE TESTE; REAGENTE QUÍMICO) – FATEC S.A.

Após a homogeneização da amostra por movimentos de inversão do tubo, foi retirado 1 mL do leite e colocado em tubo de ensaio, sendo adicionado uma gota (0,03 mL) de antígeno a cada tubo, procedendo-se, então, à homogeneização, novamente por inversão cuidadosa do tubo, impedindo a formação de espuma e evitando a permanência do antígeno nas paredes do tubo. Este material foi incubado a 37°C por 1h e interpretado, segundo as normas estabelecidas no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2001), da seguinte forma:

Leite Negativo – anel de nata branco, coluna roxo-azulada.

Leite Positivo – anel de nata e coluna com tonalidade roxo-azulados, anel de nata roxo-azulado e coluna de leite branca.

#### **4.5.1.2.1 – Modificação no Teste do Anel**

Para a validação da modificação na técnica descrita por GARCIA-CARRILO (1982), o TAL foi realizado em 69 amostras individuais de leite e 68 amostras de leite de latões. Desta forma, foi retirado 1 mL das amostras e realizada a técnica, logo após a chegada das amostras ao laboratório, 6 a 8 horas após a colheita período, durante o qual, foram mantidas sob refrigeração. Em seguida, as amostras refrigeradas, com a adição do conservante (formalina 0,01%) foram mantidas em refrigeração por um período de 24 horas e submetidas à realização do TAL de forma idêntica às anteriores.

#### **4.5.2 – Provas Sorológicas**

##### **4.5.2.1 – Prova do Antígeno Tamponado Acidificado (ATA)**

Realizada com base na metodologia de Mac MILLAN (1990), utilizando-se antígeno constituído por suspensão celular inativada de *B. abortus* (amostra 1119-3), na concentração de 8%, pH 3,65, corado com rosa bengala da seguinte forma:

O soro e o antígeno permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos antes de se realizar a prova.

Depositou-se em placa quadriculada padrão, 0,03 mL do soro a ser testado e ao seu lado 0,03 mL do antígeno. A homogeneização do soro e antígeno foi realizada com bastão de vidro, formando círculos de, aproximadamente, 2 cm de diâmetro por um período de 4 minutos, com movimentos circulares, na razão de 10-12 movimentos por minuto.

A leitura foi realizada após o termino deste período e os resultados interpretados, a partir da reação de aglutinação, indicados pela formação de grumos nos animais positivos e ausência dos mesmos nos animais negativos.

#### **4.5.2.2 – Soroaglutinação lenta em tubos (SAL)**

Realizada de acordo com a técnica descrita por ALTON et al. (1976).

Utilizou-se antígeno constituído de uma suspensão inativada de *B. abortus* amostra (1119-3), na concentração de 4,5%.

O soro e o antígeno permaneceram por 30 minutos em temperatura ambiente antes da realização da prova. O antígeno foi diluído a 1% em solução salina 0,85% e fenolado a 0,5% no momento do uso. Foram utilizados 8 tubos de vidro dispostos em seqüência, sendo que primeiro tubo depositado 0,16 mL de soro a ser testado, adicionado de 4 mL do antígeno diluídos, que corresponderam à diluição 1:25 da amostra. Nos demais tubos, foram colocados 1 mL de antígeno.

A partir da homogeneização do primeiro tubo (1:25) em agitador, transferiram-se 2 mL para o tubo subsequente (sendo desprezados 2 mL do tubo final). Foram constituídas, assim, sucessivas diluições (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200).

Os tubos foram incubados, em estufa, à temperatura de 37°C, por um período de 48 horas, quando se procedeu a leitura.

Foram consideradas como positivas as amostras que apresentaram película de aglutinação no fundo do tubo, sobrenadante límpido e formação de grumos ao

se agitar levemente o tubo. Nas amostras negativas, a coluna apresentou-se turva com ou sem depósito que se dissolveu após a leve agitação do tubo.

#### **4.5.2.3 – 2-Mercaptoetanol (2-ME)**

A metodologia foi baseada na técnica descrita por ALTON et al. (1976).

Utilizou-se antígeno da prova de SAL diluído em solução salina (0,85%), na proporção de 1:50. A solução de 2 ME foi constituída por 0,71mL de 2-Mercaptoetanol, adicionado de 99,29mL de solução salina (0,85%) totalizando um volume de 100mL. Foram utilizados tubos de vidro dispostos em bancada apropriada, sendo que, no primeiro tubo, foi colocado 0,08mL de soro a ser testado, 1mL do antígeno e 1mL da solução 2-ME (preparados como descrito anteriormente). Este tubo correspondeu à diluição de 1:25 da amostra. Nos demais tubos, foram dispostos 0,5mL de antígeno e 0,5mL de solução 2-ME. Após a homogeneização do primeiro tubo (1:25) em agitador, foi transferido 1mL para o tubo subsequente (sendo desprezado 1mL do último tubo). Foram constituídas, assim, sucessivas diluições (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200).

Os tubos foram incubados à temperatura de 37°C por um período de 48 horas, sendo então realizada a leitura dos mesmos.

As amostras positivas foram interpretadas pela presença de película (aglutinação) no fundo do tubo, sobrenadante límpido, e formação de grumos ao se agitar, levemente, o tubo. Nas amostras negativas, a coluna se encontrava turva, com ou sem depósito, que se dissolveria à agitação do tubo.

Em todas as provas sorológicas e TAL, foram utilizados soros e leite sabidamente positivos como controle da reação.

#### **4.6 – Aplicação do Questionário Epidemiológico**

Foi aplicado um questionário epidemiológico que teve como objetivo investigar fatores clínicos e epidemiológicos de risco para brucelose das propriedades avaliadas (ANEXO 03).

#### 4.7 – Análise Estatística

O Teste do Anel foi avaliado quanto à proporção de soros positivos detectados nas amostras pelo teste de McNemar (ZAR, 1996).

Os resultados foram analisados considerando-se a prova de 2-ME, avaliada, paralelamente, à SAL como confirmatória no diagnóstico da Brucelose Animal de acordo com BRASIL (2001).

As propriedades classificadas como positivas e negativas para brucelose foram comparadas em relação à produção média de leite pelo teste t de Student (ZAR, 1996) para amostras individuais.

A sensibilidade e especificidade do TAL foram calculadas com base no win episcopy 2.0 (DE BLAS et al., 2000).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – Resultados do Califórnia Mastitis Test (CMT)

Das 464 amostras de leite analisadas frente ao CMT, 242 (52,15%) foram positivas neste teste, apresentando reação em uma ou mais cruces.

Dos animais que resultaram positivos ao CMT, 71 (29,34%) eram submetidos à ordenha manual e 171 (70,66%) à ordenha mecânica.

### 5.2 – Resultados Sorológicos

Das 464 amostras de soro sanguíneo analisadas, 38 (8,19%) apresentaram resultados positivos ao ATA e 32 (6,9%) ao 2-ME em associação com a SAL (Tabela 1), caracterizando 6,9% de animais brucélicos na população estudada. Foram observadas ainda 6 (1,3%) amostras de soro sanguíneo que apresentaram resultados inconclusivos com títulos sorológicos de 50 à SAL e negativos ao 2-ME.

**Tabela 01:** Números totais de amostras de soro bovino positivas para brucelose ao Antígeno Acidificado Tamponado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME). Botucatu, 2003.

| Testes      | ATA             | SAL             | ATA/SAL         | ATA/SAL/2-ME    | Total de Amostras |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Nº Amostras | 00 <sup>1</sup> | 27 <sup>2</sup> | 06 <sup>3</sup> | 32 <sup>4</sup> | 464               |

1 – Positividade somente ao Antígeno Acidificado Tamponado

2 – Positividade somente na Soroaglutinação lenta em tubos

3 – Positividade no Antígeno Acidificado Tamponado e Soroaglutinação lenta em tubos

4 – Positividade Antígeno Acidificado Tamponado, Soroaglutinação lenta em tubos e 2-Mercaptoetanol

### 5.3 – Resultados do Teste do Anel (TAL)

#### 5.3.1 – Resultados do Teste do Anel Individual

Das 464 amostras individuais de leite analisadas, frente ao TAL, 123 (26,50%) apresentaram resultados positivos neste teste.

Dentre as 123 amostras positivas ao TAL, somente 28 (22,76%) resultaram positivas ao 2-ME. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 02.

**Tabela 02:** Resultados do Teste do Anel (TAL) em 464 amostras de leite bovino individual comparativamente aos obtidos nas provas Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME). Botucatu-SP, 2003.

| TESTE DO ANEL | SAL/2-ME  |            |            |
|---------------|-----------|------------|------------|
|               | POSITIVO  | NEGATIVO   | TOTAL      |
| POSITIVO      | 28        | 95         | 123        |
| NEGATIVO      | 4         | 337        | 341        |
| <b>TOTAL</b>  | <b>32</b> | <b>432</b> | <b>464</b> |

Das 123 amostras positivas ao TAL, 95 pertenciam a animais sorologicamente negativos ao 2-ME e 4 das 341 amostras negativas ao TAL pertenciam a animais sorologicamente positivos ao 2-ME, caracterizando 77,23% das reações falso-positivas e 1,2% de reações falso-negativas no TAL individual.

Dentre as 95 amostras de leite individuais que resultaram falso-positivas ao TAL, 28 (29,5%) apresentavam CMT positivo em uma ou mais cruzes no quarto sorteado para realização do teste. Destas, 16 pertenciam a animais sorologicamente negativos pelas diferentes técnicas, 9 correspondiam a animais positivos na SAL e 3 positivos no ATA e SAL. Adicionalmente, 18 (18,9%) das amostras falso-positivas no TAL, embora CMT negativo, pertenciam a animais sorologicamente positivos na SAL. (Tabela 3).

Foram observados 4 resultados falso-negativos no TAL individual em animais que apresentaram títulos sorológicos variando de 50 a 200 à SAL e 2-ME respectivamente.

A sensibilidade e especificidade do TAL realizado em amostras individuais de leite resultaram, respectivamente, 87,5% e 78%.

**Tabela 3:** Resultados do Teste do Anel (TAL) em 464 amostras de leite bovino individual associados aos resultados obtidos no Califórnia Mastitis Test (CMT). Botucatu, 2003.

|                  | TESTE DO ANEL<br>POSITIVO | TESTE DO ANEL<br>NEGATIVO | TOTAL      |
|------------------|---------------------------|---------------------------|------------|
| <b>CMT ( - )</b> | 86                        | 232                       | 318        |
| <b>CMT( + )</b>  | 37                        | 109                       | 146        |
| <b>TOTAL</b>     | <b>123</b>                | <b>341</b>                | <b>464</b> |

CMT ( - ) = Carlifornia Mastite Teste negativo

CMT( + ) = Carlifornia Mastite Teste positivo uma ou mais cruces

Dentre as 86 amostras de leite individual que resultaram TAL positivo e CMT negativo, 18 (21%) apresentaram SAL positiva e 19 (22%) ATA, SAL e 2-ME positivos. Das 37 amostras que resultaram TAL positivo e CMT positivo em uma ou mais cruces, 9 (24,3%) apresentaram SAL positiva, 3 (8,1%) ATA e SAL positivas e 9 (24,3%) ATA, SAL e 2-ME.

Os resultados detalhados do TAL individual, comparativamente aos sorológicos e aos do CMT podem ser observados no anexo 1.

### 5.3.2 – Resultado do Teste do Anel em Latões

Foram avaliadas amostras de leite de 54 latões. Todos os latões possuíam um volume de leite de 50 litros, com exceção de 4 que continham uma média de 25 a 30 litros de leite.

Os latões eram compostos por leite de, no mínimo, 3 e, no máximo, de 19 animais.

Das 54 amostras de leite de latões analisadas pelo TAL, 16 (29,63%) resultaram positivas e possuíam leite de animais sorologicamente positivos à 2-ME, 1 (1,85%) resultou positivo ao TAL, porém, todos os animais que o compunham resultaram negativos à 2-ME e 3 (5,56%) latões foram classificados como TAL negativos, todavia, possuíam leite de animais positivos à 2-ME caracterizando falsos negativos (Tabela 04).

**Tabela 04:** Resultados do Teste do Anel (TAL) em 54 amostras de leite comparativamente à classificação sorológica individual dos animais que compunham o latão. Botucatu-SP, 2003.

| SOROLOGIA DOS ANIMAIS | TESTE DO ANEL LATÕES |          |       |
|-----------------------|----------------------|----------|-------|
|                       | POSITIVO             | NEGATIVO | TOTAL |
| POSITIVO              | 16                   | 3        | 19    |
| NEGATIVO              | 1                    | 34       | 35    |
| <b>TOTAL</b>          | 17                   | 37       | 54    |

Dos latões analisados, 19 eram compostos por leite de animais brucélicos, caracterizando 35,2% de latões contaminados.

O TAL detectou um mínimo de 1 animal positivo cujo título sorológico na SAL e 2-ME era 200 e 100, respectivamente, entre outros 18 animais sorologicamente negativos no latão.

Falso negativo no TAL foi observado em latões contendo leite de 6 animais, sendo 1 destes, sorologicamente, positivo com título de 50 e 25 na SAL e 2-ME, respectivamente, e em latões contendo leite de 12 animais, sendo 2 sorologicamente positivos com títulos variando de 50 a 200.

Os resultados do TAL em amostras de leite de latões caracterizaram sensibilidade de 84,2% e especificidade de 97,1%.

Os resultados detalhados, do TAL em latões frente à presença ou ausência de animais sorologicamente positivos, estão apresentados no anexo 2.

### 5.3.3 – Resultado na Modificação no Teste do Anel

Não foi observada nenhuma alteração nos resultados dos leites, imediatamente processados frente aos refrigerados por 24 horas com conservante.

## **5.4 – Resultados do Inquérito Epidemiológico**

### **5.4.1 – Composição do rebanho**

Em 11 (84,62%) das propriedades, o rebanho avaliado foi predominantemente mestiço, resultante do cruzamento entre a raça Holandesa e as Zebuínas, Gir ou Nelore. Em apenas 2 (15,38%), foram observadas exclusivamente, rebanho de raça holandesa Puro por Cruza.

### **5.4.2 – Regime de Criação**

Em 09 (69,23%) das propriedades, o regime de criação era semi-intensivo, e em 04 (30,77%) os animais eram criados em sistema extensivo.

### **5.4.3 – Aquisição dos Animais**

Das 13 propriedades, 11 (84,62%) adquiriam animais por compra direta de vizinhos na região, 01 (7,69%) adquiria animais em leilões e 01 (7,69%) trabalhava no sistema de cria e recria com o aproveitamento das fêmeas para reposição do rebanho, sendo os machos vendidos após a desmama.

Apenas 04 (30,77%) exigiam a apresentação do atestado de brucelose, antes da aquisição dos animais.

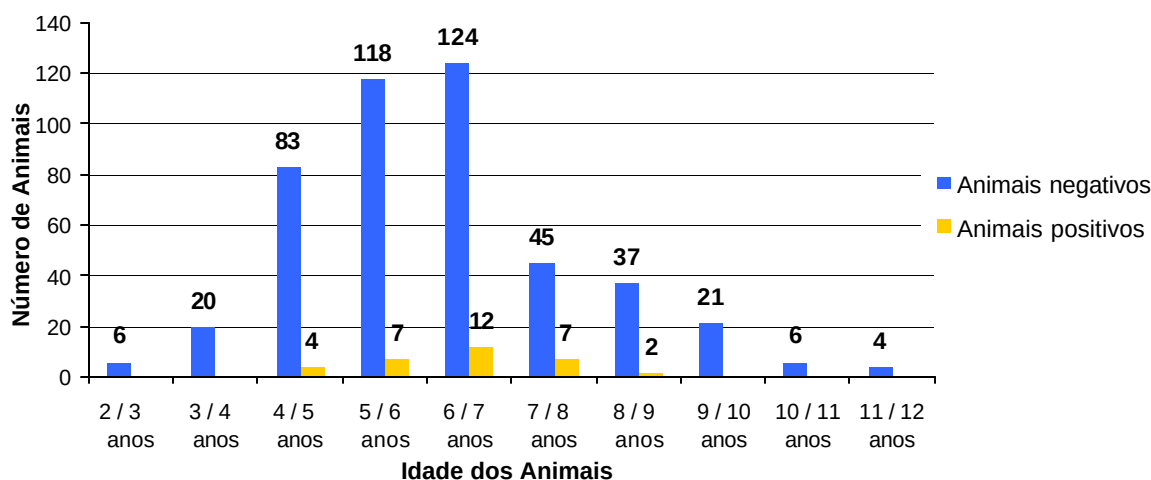
Nas propriedades em que os proprietários exigiam atestados sorológicos negativos para brucelose ou nas quais os animais eram adquiridos em leilão, e na que realizava sistema de cria e recria, não foram observados animais positivos para a enfermidade.

Todas as propriedades em que os animais eram adquiridos, sem exigência de caráter sanitário, apresentavam animais sorologicamente positivos.

#### 5.4.4 – Características dos Animais

A faixa etária dos animais estudados variou de 2 a 12 anos de idade, com o maior número de animais 325 (70,0%) com idade entre 4 e 7 anos. Todos os animais positivos apresentavam idade situada entre 4 a 9 anos (Gráfico 01).

**Gráfico 01:** Número de animais avaliados distribuídos por faixa etária e número de animais sorologicamente positivos e negativos para brucelose. Botucatu, 2003.



#### 5.4.5 – Performance Sanitária

Somente 2 (15,38%) das propriedades avaliadas realizavam a vacinação de brucelose em fêmeas entre 3 a 8 meses de idade, apesar do conhecimento dos proprietários quanto à necessidade de vacinação.

A atenção profilática foi enfocada para o controle da febre aftosa em 100% das propriedades.

Foi relatada a ocorrência de abortamento, no terço final da gestação, em 08 (61,5%) das propriedades, onde 07 (53,85%) destas apresentavam animais positivos a SAL e 2-ME, uma não possui animais sorologicamente positivos e uma possui animais sorologicamente positivos, mas, não havia relato de abortamento.

### 5.5 – Produção de leite por propriedade

A média de produção global de leite das 13 propriedades avaliadas foi de 5,6 litros de leite por animal, com variação de 2,6 a 7,1 litros por propriedade.

Foram estudadas 08 (61,54%) propriedades que possuíam animais sorologicamente positivos para brucelose, sendo classificadas como propriedades positivas e 05 (38,46%) consideradas negativas, com base na SAL e 2-ME, conseqüente à ausência de animais sorologicamente positivos. As propriedades positivas apresentaram uma média de produção de 5,0 litros de leite por animal, enquanto que as propriedades negativas apresentaram produção média de 6,5 litros por animal, diferença estatisticamente significativa.

## 6 – DISCUSSÃO

Comparando-se a média da produtividade de leite entre as propriedades que apresentaram animais sorologicamente positivos para brucelose e as propriedades livres da enfermidade, pode-se observar uma redução em torno de 23,07% na produção de leite destes animais, eventualmente o manejo e característica racial pode interferir. A diminuição na produção de leite é também relatada por ROSENBERGER (1983) e RADOSTITIS et al., (1995) corroborando o observado neste estudo e está de acordo com FARIA (1984) que relata que as perdas com a diminuição da produção láctea no rebanho chegam em torno de 20 a 25%.

A faixa etária de 5 a 7 anos, onde foi observada a maior positividade, justifica-se por estes animais apresentarem um maior tempo de exposição à brucela (NIELSEN et al., 1990) e também por descarte gradual dos animais, realizado, normalmente, a partir de 8 – 9 anos de idade nas propriedades avaliadas.

O Teste do Anel Individual apresentou 77,23% de resultados falso-positivos e 3,25% de falso-negativos. Das reações falso-positivas no TAL individual, observadas neste estudo, 20,2% foram encontrados em animais com reações uma ou mais cruces no CMT, sugerindo estarem relacionados à mastite dos animais. Estes resultados são similares aos encontrados por CHIELLE et al. (1989) que obtiveram um elevado percentual de reações falso-positivas no TAL em animais com CMT positivo, concluindo que as causas mais prováveis de falso-positivas, no teste, seriam a presença de IgA e IgM presentes no leite. Esta possibilidade é corroborada, adicionalmente, pela afirmação de vários autores (OLASCOAGA, 1976; NICOLETTI, 1994; ACEDO et al., 1997) da ocorrência de reações falso-positivas por mastite no teste.

Das 123 amostras positivas ao TAL individual, 30 (24,4%) amostras resultaram, sorologicamente, positivas à SAL e ao ATA e negativas ao 2-ME. Considerando a inativação da IgM pelo 2-ME (NIELSEN et al., 1990) estes resultados sugerem que as reações falso-positivas podem ser decorrentes da

presença de IgM, uma vez que esta classe de imunoglobulina, juntamente com a IgA, é uma das principais responsáveis pela reação (SUTRA et al. ,1986; DIAS e BLASCO ,1994 citado por LOPEZ et al., 1998).

Neste estudo o TAL em amostras individuais de leite apresentou sensibilidade de 87,5%, resultados similares aos encontrados por ZOGHI et al. (1992), que detectaram 1632 amostras de leite positivas ao TAL dentre 1956 animais sorologicamente positivos, caracterizando 83,4% de sensibilidade.

A especificidade do TAL em amostras individuais foi de 78%, discordando dos resultados observados por HUBER e NICOLETTI (1986) que ao avaliar o TAL em 1003 amostras individuais de leite caracterizaram especificidade de 57,5%. A discrepância pode ser justificada pelos diferentes métodos utilizados para definição da especificidade, uma vez que estes autores avaliaram a técnica frente a FC. Baixa especificidade do TAL em amostras individuais de leite foi, também, descrita por OLASCOAGA (1976) e por HECK et al. (1980) os quais consideraram que em função da baixa especificidade do teste individual, os animais positivos ao TAL deveriam ser reavaliados em outras provas sorológicas.

Resultados negativos no TAL individual foram obtidos em 4 (0,9%) animais. Resultados negativos no teste foram, também, observados por TOMÉ e SAMARTINO (1997) que, dentre 15 animais sorologicamente positivos, 2 apresentaram-se negativos ao TAL. Os autores consideraram o TAL muito útil na vigilância epidemiológica das áreas livres, porém, para determinar animais individuais e/ou propriedades infectadas por brucelose, consideraram seus resultados variáveis e dependentes de alguns fatores como período de eliminação e quantidade de anticorpos presentes no leite de animais infectados, tamanho da propriedade e frequência com que se realiza o controle do rebanho.

O TAL no latão foi capaz de detectar 16 (84%) dos latões infectados pertencentes a 6 propriedades, representando 75% do total de propriedades com animais brucélicos, se caracterizando como importante método de vigilância epidemiológica concordante com a OIE (2000) que indica seu uso para amostra de leite em latões para rebanhos até 100 animais.

Dos latões analisados, o TAL detectou um mínimo de 1 animal sorologicamente positivo ao 2-ME com título de 200 e 100, respectivamente, na SAL e 2-ME, entre outros 18 animais negativos no latão. Estes resultados estão de acordo com os relatados por ROEPKE e STILES (1970) que referem 81,8% de probabilidade de detecção de um animal brucélico entre outros 25 animais.

Por outro lado, foram observados resultados falso negativos em latões com “pool” de leite de, um mínimo, de 6, e máximo, de 12 animais e títulos variando de 50 e 25, respectivamente, na SAL e 2-ME até 200 em ambos os testes. Os resultados falso-negativos são justificados pela afirmação de TOMÉ e SAMARTINO (1997) na qual a eficácia do TAL, para detectar animais ou rebanhos infectados por brucelose, é variável e depende de fatores como a eliminação ou não de anticorpos brucélicos pelo leite e reforçados por GARCIA-CARRILHO (1982) que relata a existência de vacas infectadas que não eliminam anticorpos pelo leite.

Foi observado um resultado falso-positivo em latão composto por leite de 7 animais, dos quais um apresentava reação positiva ao ATA e SAL, demonstrando a possibilidade de reação decorrente de IgM (SUTRA et al., 1986; DIAS e BLASCO, 1994 *apud* LOPEZ et al., 1998) e 6 apresentavam resultados 2 cruces ou mais no CMT, sugerindo a interferência da mastite no teste, conforme o relatado por vários autores (OLASCOAGA, 1976; NICOLETTI, 1994; ACEDO et al., 1997).

O percentual de resultados falso-positivos em latões observado neste estudo foi inferior ao obtido por ROLFE e SYKES (1987) que obtiveram 3,7% de reações falso-positivas em latões, o que pode ser explicado pelo reduzido número de animais vacinados com B<sub>19</sub>, neste estudo, contrariamente ao estudo conduzido pelos referidos autores.

O TAL em amostras de latões foi capaz de detectar 75% das propriedades sorologicamente positivas, resultados próximos aos relatados por MORGAN (1967) que diagnosticou 75% de rebanhos infectados, porém, com 3 testes consecutivos.

O Teste do Anel em latões, no entanto, não foi capaz de detectar 2 (25%) das propriedades infectadas, demonstrando a necessidade dos testes sorológicos adicionais, concordante com o relatado por TOMÉ e SAMARTINO (1997).

## 7 – CONCLUSÕES

- O Teste do Anel individual apresentou elevado percentual de reações falso-positivas, não indicando sua utilização rotineira.
- O Teste do Anel em latões apresentou baixo percentual de falso-positivos e negativos, corroborando a sua utilização como método diagnóstico presuntivo da brucelose bovina para rebanhos.
- O Teste do Anel em latões pode se constituir em uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica em laticínios.
- A aplicação de técnicas sorológicas individuais é fundamental para o diagnóstico eficiente da brucelose bovina de animais e rebanhos infectados.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ACEDO, E.; DÍAS, M.E.; LEÓN A.B. Incidencia de *Brucella* sp en leche cruda y queso fresco regional. **Alimentaria**, Madrid, v.34, p.57-60, 1997.

ALTON, G.G., JONES, L.M., PIETZ, D.E. Las técnicas de laboratorio de la brucelosis. Geneva: WHO, 1976. p. 68-133 (**OMS Série Monográfica**, v.55).

BARR, B. C., ANDERSON, M. L. Infectious diseases causing bovine and fetal loss. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, Philadelphia, v.9, p.343-368, 1993.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brucelose bovina. **Bol. Def. Sanit. Anim.**, v.27, p.41-47, 1991.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**: legislação. Brasília, 2001. 47p.

BUTLER, J.E., MAXWELL, C.F. Preparation of bovine immunoglobulins and free secretory component and their specific antiserum. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.55, p.151-164, 1971.

CAMPERO, C. M. Brucelosis en toros: una revisión. **Rev. Med. Vet.**, Buenos Aires, v.74, p.8-14, 1993.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS previews database*. Philadelphia, 1996. 468p.

COELHO, L.M.; MARTINS, L.; EVANGELISTA, F.H. Prevalência da brucelose nos trabalhadores de matadouro em São Luís, Estado do Maranhão. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v.17, p.85-88, 1995.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOZOOSES. **Proceedings**...Atlanta: National Center for Infections Diseases, 1999. p.1-16. Disponível em: <http://www.cdc.gov>. Acesso em: 22 mar. 1999.

CHIELLE, L. L.; WEIBLEN, B.; MOREIRA, W. S.; FLÔRES, M. L. Especificidade da prova do anei de leite (PAL) para o diagnóstico da brucelose bovina na bacia leiteira do município de Santa Maria – RS, Brasil. **Rev. Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.19, n.4, p.351-358, 1989.

DE BLAS, N.; ORTEGA, C.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN, J.; THRUSFIELD, M. **Win Episcopo 2.0**. Zaragoza: CLIVE, 2000. Disponível em: <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo>. Acesso em: 11 out. 2003.

FARIA, J. F. Situação da brucelose no Brasil. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São. Paulo**, São Paulo, v.8, p.161-175, 1984.

FERRAZ, I B. F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.23, p.504-508, 1999.

FONSECA, L.F.L., SANTOS, M. V. Granelização e qualidade de leite. In: INSTITUTO FERNANDO COSTA. **Primeiro curso online sobre qualidade do leite**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso em: 25 ago.2001

FOSTER, G. A review of Brucella sp. Infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 90, p. 563-580, 2002.

FRASER, M. C. **Manual Merck de veterinária**: manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário. 7.ed. São Paulo: Roca, 1991, p.693-696.

GARCIA-CARRILLO, C. Pruebas suplementarias para el diagnostico de la brucelosis. **Nota Tec. Cent. Panam. Zoonosis.**, Buenos Aires, n.25, p. 5-19, 1982.

HECK, F. C.; WILLIAMS, J. D.; PRUETT, J.; SANDERS, R.; ZINK, D.L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.41, p.2082-2084, 1980.

LEITE BRASIL. Associação Brasileira de Produtores de Leite. 2000. Disponível em: [www.leitebrasil.org.br/estatística.htm](http://www.leitebrasil.org.br/estatística.htm). Acesso em: 11 out. 2003.

LOPEZ, J.; BEST, A.; MORALES, C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el ring test y ELISA en lecherías de la provincia de Nuble (VIII Región). **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v.30, p.133-138, 1998.

LORD, V. R.; SCHURIG, G. G.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; MARCANO, M. J.; MELENDEZ, G. E. Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.59, p.1016-1020, 1998.

MacMILLAN, A. Conventional serological test. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. chap.8, p.153-198.

MARTINS, M. V. F. A brucella e os produtos alimentares de origem animal. **Vet. Tec.**, v.2, p.20-23, 1994.

MATHIAS, L. A.; MACMILLAN, A. P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Pesqui. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.15, p.101-105, 1995.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TURY, E.; SOUZA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Rev. Bras. Med. Vet.**, Rio de Janeiro, v.19, p.157-162, 1997.

MORGAN, W.J.B. The serological diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. Rec.**, London, v.80, p.612-621, 1967.

NICOLETTI, P. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. **Bovis**, v.57, p.17-25, 1994.

NIELSEN, K. DUNCAN, J.R. **Animal Brucellosis**, Boca Raton: CRC Press., 1990. 453 p.

NIELSEN, K.; WRIGHT, P.F.; KELLY, W. A.; CHERWONOGRODZKY, J.W. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol**, Amsterdam, v.24, p.373-382, 1988.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Bovine Brucellosis. In:\_\_\_\_. **Manual standards diagnostic tests vaccines**. Paris, 2000. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/A\\_B103.htm](http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/A_B103.htm)> Acesso em: 10 nov. 2000.

OLASCOAGA, C. R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, Buenos Aires, v.18, p.107-141, 1976.

OLIVEIRA, S. C.; SPLITTER, G. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+T cells from Brucella-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. **Cel. Immunol.**, Orlando, v.172, p.262-268, 1996.

ORTOLANI, E. L.; COSTA, E. O.; SCHMIDT, A. M.; VISINTIN, L. C. Acompanhamento sorológico de bovinos adultos vacinados com amostra B19. Teste de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v.39, p.377-386, 1987.

PALMER, M. V.; OLSEN, S. C.; CHEVILLE, N. F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.58, p.472-477, 1997.

PIETZ, D. E.; COWART, W. O. Use of epidemiologic data and serologic test in bovine brucellosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.177, p.1221-1226, 1980.

RADOSTITIS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine: a textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** 8.ed. London: Bailliere Tindall, 1995. 1763p.

ROEPKE, M. H.; STILES JR.; F.C. Potential efficiency of milk ring test for detection of brucellosis. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 31, n. 12, p. 2145-2149, dec. 1970.

ROSENBERGER, G. **Enfermedades de los bovinos.** Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1983. v.2, p.76-86.

ROXO, E. Atual situação brasileira de Brucelose nos rebanhos animais. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA**, 27, 2000, Águas de Lindóia. Resumo... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária – SBMV, 2000.

SALATA, R. A. Brucelose. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil**: tratado de medicina interna. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. v.2, p.1852-1854.

SAMARA, S. I.; SEIXAS, L. F. Z.; OLIVEIRA, M. A. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueiras - SP: II - Brucelose. **Ars Vet.**, Jaboticabal, v.12, p.137-140, 1996.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Assoc.**, Schaumburg, v. 130, p. 199-204, 1957.

SOUZA, A. P.; MOREIRA FILHO, D. C.; FÁVERO, M. Investigação da brucelose em bovinos e em consumidores humanos de leite. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.11, p.238-247, 1977.

SUTHERLAND, S. S. Immunology of bovine brucellosis. **Vet. Bull.**, Fornham Royal, v.50, p.359-368, 1980.

SUTRA, L.; CAFFIN, J. P.; DUBRAY, G. Role of milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.12, p.359-366, 1986.

TEIXEIRA, A. C. P.; SOUZA, C. F. A.; SÁ, M. J. S.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L., SOUZA, R. M. Brucelose: zoonose controlada? **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.12, p.23-25, 1998.

THOEN, C. O.; BRUNER, J. A.; LUCHSINGER, D. W.; PIETZ, D. E. Detection of *Brucella* antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.44, p.306-308, 1983.

TOBIAS, L.; SCHURIG, G.G.; CORDES, D.O. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. **Res. Vet. Sci.**, London, v.53, p.179-183, 1992.

TOMÉ, J. G., SAMARTINO, L. E. Eficacia de la prueba del anillo en la leche para el control y erradication de la brucelosis bovina. **Vet. Argent.**, Buenos Aires, v.14, p.449-459, 1997.

XAVIER, A. J. Modernização do setor produtivos de leite e derivados. **Boletim do Leite**, FEALQ/ESALQ/USP. 22 de agosto de 1999, 6p.

XOLALLPA CAMPOS, V.M.; JARAMILLO ARANGO, C. J.; ALONSO PESADO, F. Evaluación financeira de un programa de control de la brucelose bovina en la Camarca Lagunera (1987 a 1990). **Vet. Mex.**, Mexico, v.24, p.127-134, abr.-jun. 1993.

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

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

**Anexo 01:** Propriedade 1. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade | Animal | Idade    | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL  | 2-ME |
|-------------|--------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|------|------|
|             |        |          |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |      |      |
| 1           | 1      | 3-4 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | N    | N    |
| 1           | 2      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 3      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 4      | 6-7 anos | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 5      | 5-6 anos | Mecânica | +   | +   | +   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 6      | 4-5 anos | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 1           | 7      | 6-7 anos | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 8      | 5-6 anos | Mecânica | -   | ++  | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 9      | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | +   | N    | P         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 10     | 7-8 anos | Mecânica | -   | -   | +   | +   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 1           | 11     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 12     | 8-9 anos | Mecânica | -   | -   | +   | +++ | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 13     | 3-4 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 14     | 7-8 anos | Mecânica | TP  | +   | -   | +   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 15     | 6-7 anos | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 16     | 5-6 anos | Mecânica | -   | ++  | +   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 17     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 18     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 19     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 20     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | +   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 1           | 21     | 4-5 anos | Mecânica | +   | ++  | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 22     | 6-7 anos | Mecânica | +   | +++ | +++ | +++ | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 23     | 8-9 anos | Mecânica | ++  | -   | ++  |     | N    | P         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 24     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 25     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | 1:25 | N    |
| 1           | 26     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1           | 27     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 28     | 5-6 anos | Mecânica | TP  | -   | +   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 29     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 30     | 8-9 anos | Mecânica | -   | +   | -   | TP  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 31     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1           | 32     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | N    | P         | AD      | N   | N    | N    |
| 1           | 100    | 6-7 anos | Manual   | +++ | +++ | +++ | +++ | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL  | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|------|------|
|                                                |        |           |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |      |      |
| 1                                              | 101    | 9-10 anos | Manual  | +   | +++ | -   | ++  | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 102    | 8-9 anos  | Manual  | ++  | +   | ++  | ++  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 103    | 6-7 anos  | Manual  | ++  | +++ | +   | +++ | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 104    | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 105    | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 106    | 9-10 anos | Manual  | +++ | +++ | +++ | +++ | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 1                                              | 107    | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AD      | N   | 1:25 | N    |
| 1                                              | 108    | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| Média de produção de leite = 6,7 litros/animal |        |           |         |     |     |     |     |      |           |         |     |      |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 2. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade    | Ordenha  | CMT |     |     |    | TALL | TALI      |         | ATA | SAL  | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|----------|----------|-----|-----|-----|----|------|-----------|---------|-----|------|------|
|                                                |        |          |          | AE  | AD  | PE  | PD |      | Resultado | Sorteio |     |      |      |
| 2                                              | 1      | 4-5 anos | Mecânica | +   | -   | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 2      | 7-8 anos | Mecânica | -   | -   | ++  | -  | P    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 3      | 7-8 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 4      | 4-5 anos | Mecânica | +   | +   | +   | -  | N    | P         | AE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 5      | 5-6 anos | Mecânica | +   | -   | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 6      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 7      | 4-5 anos | Mecânica | +++ | -   | -   | +  | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 8      | 4-5 anos | Mecânica | ++  | ++  | +   | -  | N    | P         | PD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 9      | 8-9 anos | Mecânica | +   | -   | ++  | -  | P    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 10     | 5-6 anos | Mecânica | +   | -   | -   | -  | P    | P         | AD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 11     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | P    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 12     | 5-6 anos | Mecânica | ++  | -   | -   | -  | P    | P         | AD      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 13     | 5-6 anos | Mecânica | ++  | -   | ++  | +  | P    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 14     | 6-7 anos | Mecânica | ++  | +   | -   | ++ | P    | P         | AE      | P   | 1:50 | N    |
| 2                                              | 15     | 8-9 anos | Mecânica | ++  | TP  | +++ | -  | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 16     | 4-5 anos | Mecânica | +++ | -   | +   | +  | N    | P         | AE      | N   | N    | N    |
| 2                                              | 17     | 6-7 anos | Mecânica | ++  | +++ | +++ | -  | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| Média de produção de leite = 7,1 litros/animal |        |          |          |     |     |     |    |      |           |         |     |      |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 3. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade    | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL      | 2-ME  |
|------------------------------------------------|--------|----------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|----------|-------|
|                                                |        |          |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |          |       |
| 3                                              | 1      | 5-6 anos | Manual  | -   | +   | -   | -   | P    | N         | PD      | P   | 1:50     | 1:50  |
| 3                                              | 2      | 5-6 anos | Manual  | TP  | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 3      | 4-5 anos | Manual  | ++  | -   | ++  | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 4      | 8-9 anos | Manual  | +   | -   | +++ | TP  | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 5      | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 6      | 5-6 anos | Manual  | +   | -   | +   | -   | P    | P         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 7      | 5-6 anos | Manual  | +   | +   | ++  | +   | P    | P         | AE      | P   | 1:400    | 1:200 |
| 3                                              | 8      | 6-7 anos | Manual  | TP  | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 9      | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 10     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 11     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 12     | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 13     | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | +   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 14     | 8-9 anos | Manual  | -   | +   | -   | +   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 15     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | ++  | +   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 16     | 6-7 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400    | 1:200 |
| 3                                              | 17     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 18     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 19     | 6-7 anos | Manual  | +++ | +++ | -   | +   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 20     | 4-5 anos | Manual  | +   | +   | +   | +   | P    | P         | AE      | P   | 1:50     | 1:50  |
| 3                                              | 21     | 8-9 anos | Manual  | +++ | +++ | ++  | ++  | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 22     | 5-6 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 23     | 7-8 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 24     | 6-7 anos | Manual  | -   | +++ | -   | -   | P    | N         | AD      | P   | 1:100(I) | 1:50  |
| 3                                              | 25     | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 26     | 7-8 anos | Manual  | +   | -   | TP  | +++ | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 27     | 2-3 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 28     | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | +   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 29     | 3-4 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 3                                              | 30     | 4-5 anos | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| Média de produção de leite = 5,0 litros/animal |        |          |         |     |     |     |     |      |           |         |     |          |       |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 4. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade | Animal | Idade    | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL   | 2-ME  |
|-------------|--------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|-------|-------|
|             |        |          |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |       |       |
| 4           | 1      | 3-4 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 4           | 2      | 5-6 anos | Mecânica | -   | TP  | -   | -   | P    | N         | AE      | P   | 1:200 | 1:200 |
| 4           | 3      | 3-4 anos | Mecânica | ++  | -   | ++  | -   | P    | P         | AD      | N   | N     | N     |
| 4           | 4      | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 4           | 5      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | +   | P    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 6      | 7-8 anos | Mecânica | ++  | TP  | ++  | +   | P    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 7      | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | ++  | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 4           | 8      | 5-6 anos | Mecânica | -   | ++  | -   | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400 | 1:200 |
| 4           | 9      | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 4           | 10     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 4           | 11     | 3-4 anos | Mecânica | ++  | +   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 4           | 12     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 13     | 5-6 anos | Mecânica | +   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 4           | 14     | 7-8 anos | Mecânica | TP  | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 15     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 16     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 4           | 17     | 7-8 anos | Mecânica | ++  | ++  | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 4           | 18     | 5-6 anos | Mecânica | -   | +-  | -   | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:200 | 1:100 |
| 4           | 19     | 6-7 anos | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +++ | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 4           | 20     | 4-5 anos | Mecânica | +++ | ++  | -   | +++ | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 4           | 21     | 5-6 anos | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +++ | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 4           | 22     | 4-5 anos | Mecânica | -   | +++ | -   | +   | N    | P         | PD      | P   | 1:100 | 1:50  |
| 4           | 23     | 8-9 anos | Mecânica | +++ | +   | +++ | +++ | P    | N         | PE      | N   | N     | N     |

Média de produção de leite = 5,6 litros/animal

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 5. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade    | Ordenha  | CMT |     |     |    | TALL | TALI      |         | ATA | SAL | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|----------|----------|-----|-----|-----|----|------|-----------|---------|-----|-----|------|
|                                                |        |          |          | AE  | AD  | PE  | PD |      | Resultado | Sorteio |     |     |      |
| 5                                              | 1      | 5-6 anos | Mecânica | +++ | ++  | +++ | TP | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 2      | 4-5 anos | Mecânica | +   | +++ | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 4      | 4-5 anos | Mecânica | +   | -   | -   | -  | N    | N         | PD      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 5      | 6-7 anos | Mecânica | TP  | -   | +   | -  | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 6      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 7      | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N   | N    |
| 5                                              | 8      | 4-5 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N   | N    |
| Média de produção de leite = 6,7 litros/animal |        |          |          |     |     |     |    |      |           |         |     |     |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 6. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL      | 2-ME  |
|------------------------------------------------|--------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|----------|-------|
|                                                |        |           |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |          |       |
| 6                                              | 1      | 6-7 anos  | Manual  | +++ | ++  | +++ | +   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 2      | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 3      | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | TP  | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 4      | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 5      | 5-6 anos  | Manual  | -   | TP  | +++ | +++ | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 6      | 6-7 anos  | Manual  | TP  | +   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 7      | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 8      | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 9      | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 10     | 7-8 anos  | Manual  | +++ | TP  | +++ | +   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 11     | 9-10 anos | Manual  | TP  | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 12     | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | AD      | P   | 1:200(I) | 1:100 |
| 6                                              | 13     | 3-4 anos  | Manual  | -   | -   | +   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 14     | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 15     | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | AE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 16     | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 17     | 6-7 anos  | Manual  | ++  | +   | TP  | +++ | P    | P         | AE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 18     | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 6                                              | 19     | 4-5 anos  | Manual  | +++ | +++ | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| Média de produção de leite = 2,6 litros/animal |        |           |         |     |     |     |     |      |           |         |     |          |       |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 7. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade      | Ordenha | CMT |    |    |    | TALL | TALI      |         | ATA | SAL     | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|------------|---------|-----|----|----|----|------|-----------|---------|-----|---------|------|
|                                                |        |            |         | AE  | AD | PE | PD |      | Resultado | Sorteio |     |         |      |
| 7                                              | 1      | 8-9 anos   | Manual  | -   | -  | -  | TP | N    | P         | AD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 2      | 2-3 anos   | Manual  | +   | -  | -  | -  | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 3      | 6-7 anos   | Manual  | +   | ++ | +  | +  | N    | P         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 4      | 5-6 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 5      | 9-10 anos  | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AD      | N   | 1:25    | N    |
| 7                                              | 6      | 5-6 anos   | Manual  | +++ | TP | ++ | -  | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 7      | 4-5 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 8      | 6-7 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 9      | 7-8 anos   | Manual  | -   | -  | +  | -  | N    | P         | PD      | N   | 1:25    | N    |
| 7                                              | 10     | 10-11 anos | Manual  | +++ | +  | +  | +  | N    | P         | AE      | N   | 1:25(I) | N    |
| 7                                              | 11     | 6-7 anos   | Manual  | -   | +  | -  | +  | N    | P         | AD      | N   | 1:25(I) | N    |
| 7                                              | 12     | 7-8 anos   | Manual  | +++ | +  | TP | TP | N    | P         | AD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 13     | 5-6 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 14     | 5-6 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | PD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 15     | 6-7 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | PD      | N   | 1:25(I) | N    |
| 7                                              | 16     | 6-7 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 17     | 4-5 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 18     | 4-5 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 19     | 10-11 anos | Manual  | +++ | -  | TP | -  | N    | P         | AE      | N   | 1:25    | N    |
| 7                                              | 20     | 8-9 anos   | Manual  | ++  | -  | +  | ++ | N    | P         | AD      | N   | 1:25    | N    |
| 7                                              | 21     | 4-5 anos   | Manual  | -   | +  | -  | -  | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 22     | 7-8 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | PD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 23     | 6-7 anos   | Manual  | -   | -  | -  | -  | N    | P         | AD      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 24     | 4-5 anos   | Manual  | -   | -  | +  | -  | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 7                                              | 25     | 5-6 anos   | Manual  | -   | -  | -  | +  | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| Média de produção de leite = 6,0 litros/animal |        |            |         |     |    |    |    |      |           |         |     |         |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 8. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha | CMT |     |    |    | TALL | TALI      |         | ATA | SAL   | 2-ME  |
|------------------------------------------------|--------|-----------|---------|-----|-----|----|----|------|-----------|---------|-----|-------|-------|
|                                                |        |           |         | AE  | AD  | PE | PD |      | Resultado | Sorteio |     |       |       |
| 8                                              | 1      | 8-9 anos  | Manual  | -   | +   | -  | -  | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 2      | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -  | -  | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 3      | 4-5 anos  | Manual  | +   | -   | -  | -  | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 4      | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | +  | -  | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 5      | 6-7 anos  | Manual  | TP  | ++  | -  | -  | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 6      | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -  | -  | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 7      | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | -  | -  | N    | P         | AD      | P   | 1:50  | 1:50  |
| 8                                              | 8      | 8-9 anos  | Manual  | +   | -   | -  | -  | N    | P         | AD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 9      | 6-7 anos  | Manual  | -   | ++  | +  | -  | N    | P         | AE      | P   | 1:200 | 1:200 |
| 8                                              | 10     | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -  | -  | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 11     | 9-10 anos | Manual  | +++ | ++  | -  | ++ | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 8                                              | 12     | 5-6 anos  | Manual  | +++ | +++ | -  | -  | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| Média de produção de leite = 4,2 litros/animal |        |           |         |     |     |    |    |      |           |         |     |       |       |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 9. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade | Animal | Idade     | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL   | 2-ME     |
|-------------|--------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|-------|----------|
|             |        |           |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |       |          |
| 9           | 1      | 7-8 anos  | Manual  | -   | +   | TP  | -   | N    | P         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 2      | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 3      | 4-5 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 4      | 8-9 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 5      | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 6      | 5-6 anos  | Manual  | -   | +   | +   | +   | N    | N         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 7      | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 8      | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 9      | 5-6 anos  | Manual  | -   | +   | +   | +   | P    | N         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 10     | 8-9 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 11     | 4-5 anos  | Manual  | +++ | +   | +++ | +   | P    | N         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 12     | 4-5 anos  | Manual  | +   | ++  | -   | +   | P    | P         | PE      | P   | 1:100 | 1:100    |
| 9           | 13     | 6-7 anos  | Manual  | -   | +++ | TP  | +++ | P    | P         | AD      | P   | 1:400 | 1:100    |
| 9           | 14     | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | +   | +   | P    | N         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 15     | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | +   | -   | P    | N         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 16     | 8-9 anos  | Manual  | -   | +   | -   | TP  | P    | P         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 17     | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 18     | 7-8 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AD      | N   | 1:25  | N        |
| 9           | 19     | 4-5 anos  | Manual  | +++ | +++ | +++ | +   | N    | N         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 20     | 3-4 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 21     | 6-7 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 22     | 3-4 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 23     | 4-5 anos  | Manual  | +   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 24     | 5-6 anos  | Manual  | -   | +   | +   | +   | N    | P         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 25     | 8-9 anos  | Manual  | ++  | ++  | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 26     | 8-9 anos  | Manual  | +   | +   | +   | +   | P    | P         | AD      | N   | N     | N        |
| 9           | 27     | 5-6 anos  | Manual  | ++  | ++  | +   | ++  | P    | N         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 28     | 6-7 anos  | Manual  | ++  | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N     | N        |
| 9           | 29     | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 30     | 7-8 anos  | Manual  | ++  | ++  | ++  | ++  | P    | P         | PE      | N   | N     | N        |
| 9           | 31     | 6-7 anos  | Manual  | +++ | +++ | +++ | +++ | P    | P         | PD      | N   | N     | N        |
| 9           | 32     | 7-8 anos  | Manual  | -   | ++  | TP  | ++  | P    | P         | PD      | P   | 1:100 | 1:100(I) |
| 9           | 33     | 9-10 anos | Manual  | -   | -   | -   | ++  | N    | P         | PE      | N   | N     | N        |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|-----|------|
|                                                |        |           |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |     |      |
| 9                                              | 34     | 2-3 anos  | Manual  | -   | -   | +   | ++  | N    | N         | PE      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 35     | 5-6 anos  | Manual  | +   | +++ | +++ | +++ | N    | N         | AE      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 36     | 6-7 anos  | Manual  | +   | +   | TP  | +++ | N    | N         | PD      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 37     | 3-4 anos  | Manual  | ++  | ++  | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 38     | 5-6 anos  | Manual  | ++  | ++  | +   | ++  | N    | N         | PE      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 39     | 5-6 anos  | Manual  | -   | -   | +   | -   | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 40     | 9-10 anos | Manual  | -   | +   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 41     | 5-6 anos  | Manual  | -   | +   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 42     | 2-3 anos  | Manual  | -   | -   | +   | +   | N    | N         | PE      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 43     | 3-4 anos  | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N   | N    |
| 9                                              | 44     | 8-9 anos  | Manual  | +++ | -   | -   | ++  | N    | N         | AD      | N   | N   | N    |
| Média de produção de leite = 6,4 litros/animal |        |           |         |     |     |     |     |      |           |         |     |     |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 10. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL     | 2-ME |
|------------------------------------------------|--------|-----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|---------|------|
|                                                |        |           |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |         |      |
| 10                                             | 1      | 6-7 anos  | Mecânica | +++ | ++  | -   | ++  | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 2      | 3-4 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 3      | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 4      | 3-4 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 5      | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 6      | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 7      | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 8      | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 9      | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 10     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 11     | 6-7 anos  | Mecânica | +   | ++  | +++ | +++ | N    | P         | PD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 12     | 8-9 anos  | Mecânica | ++  | +   | +   | +   | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 13     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | +++ | +   | +   | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 14     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | +++ | -   | N    | P         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 15     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | +++ | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 16     | 3-4 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 17     | 8-9 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | 1:25(I) | N    |
| 10                                             | 18     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | TP  | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 19     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | N    | N         | PD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 20     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | +++ | N    | N         | PD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 21     | 5-6 anos  | Mecânica | ++  | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 22     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 23     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N       | N    |
| 10                                             | 24     | 9-10 anos | Mecânica | ++  | -   | +++ | -   | N    | P         | AE      | N   | 1:25    | N    |
| 10                                             | 25     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N    |
| Média de produção de leite = 6,0 litros/animal |        |           |          |     |     |     |     |      |           |         |     |         |      |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 11. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade                                    | Animal | Idade     | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL   | 2-ME  |
|------------------------------------------------|--------|-----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|-------|-------|
|                                                |        |           |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |       |       |
| 11                                             | 1      | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 2      | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 3      | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 4      | 9-10 anos | Mecânica | -   | -   | ++  | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 5      | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 6      | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 7      | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 8      | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 9      | 4-5 anos  | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 10     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 11     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | +   | -   | N    | P         | AE      | P   | 1:100 | 1:100 |
| 11                                             | 12     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 13     | 2-3 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 14     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 15     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | +   | +   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 16     | 8-9 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 17     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 18     | 9-10 anos | Mecânica | -   | -   | -   | TP  | N    | P         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 19     | 8-9 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | TP  | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 20     | 2-3 anos  | Mecânica | -   | -   | ++  | ++  | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 21     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 22     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 23     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 24     | 7-8 anos  | Mecânica | +++ | +++ | +++ | TP  | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 25     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 26     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 27     | 9-10 anos | Mecânica | -   | -   | +   | +++ | N    | N         | AD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 28     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 29     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | ++  | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 30     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 31     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | +   | -   | -   | N    | P         | AD      | N   | 1:25  | N     |
| 11                                             | 32     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| 11                                             | 33     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N     | N     |
| Média de produção de leite = 5,4 litros/animal |        |           |          |     |     |     |     |      |           |         |     |       |       |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 12. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade | Animal | Idade            | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL     | 2-ME     |
|-------------|--------|------------------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|---------|----------|
|             |        |                  |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |         |          |
| 12          | 1      | 5-6 anos         | Manual  | -   | ++  | +++ | +++ | P    | N         | PE      | N   | N       | N        |
| 12          | 2      | 6-7 anos         | Manual  | -   | +   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N        |
| 12          | 3      | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | +   | +   | P    | P         | AD      | P   | 1:200   | 1:200    |
| 12          | 4      | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 5      | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 6      | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 7      | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 8      | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 9      | 8-9 anos         | Manual  | -   | ++  | +++ | +   | N    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 10     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 11     | 6-7 anos         | Manual  | +++ | +   | ++  | ++  | P    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 12     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -   | ++  | P    | N         | AD      | N   | N       | N        |
| 12          | 13     | 7-8 anos         | Manual  | -   | -   | -   | +   | P    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 14     | 6-7 anos         | Manual  | -   | +++ | -   | +   | P    | P         | PD      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 15     | Acima de 11 anos | Manual  | ++  | +++ | -   | +   | P    | P         | AE      | N   | 1:25    | N        |
| 12          | 16     | 6-7 anos         | Manual  | +++ | -   | -   | ++  | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 17     | 6-7 anos         | Manual  | -   | +   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 18     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N       | N        |
| 12          | 19     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 20     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | +   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 21     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | AE      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 22     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | +   | +   | P    | P         | PE      | N   | 1:50(I) | N        |
| 12          | 23     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AD      | N   | N       | N        |
| 12          | 24     | 7-8 anos         | Manual  | -   | ++  | +++ | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 25     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 26     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 27     | 7-8 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | AE      | P   | 1:200   | 1:200    |
| 12          | 28     | 6-7 anos         | Manual  | +++ | -   | +++ | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400   | 1:400(I) |
| 12          | 29     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:400   | 1:400    |
| 12          | 30     | Acima de 11 anos | Manual  | -   | -   | ++  | +   | P    | P         | PE      | N   | N       | N        |
| 12          | 31     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N        |
| 12          | 32     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N        |
| 12          | 33     | 6-7 anos         | Manual  | +++ | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | N   | N       | N        |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade | Animal | Idade            | Ordenha | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL     | 2-ME  |
|-------------|--------|------------------|---------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|---------|-------|
|             |        |                  |         | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |         |       |
| 12          | 34     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400   | 1:400 |
| 12          | 35     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 36     | 5-6 anos         | Manual  | -   | ++  | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 37     | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 38     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N       | N     |
| 12          | 39     | 8-9 anos         | Manual  | +   | -   | +++ | +++ | P    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 40     | 10-11 anos       | Manual  | +   | -   | +   | +   | N    | P         | AD      | N   | 1:50    | N     |
| 12          | 41     | 6-7 anos         | Manual  | +++ | -   | +++ | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:100   | 1:100 |
| 12          | 42     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 43     | 10-11 anos       | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PE      | N   | 1:25(I) | N     |
| 12          | 44     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | 1:25(I) | N     |
| 12          | 45     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 46     | 5-6 anos         | Manual  | ++  | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 47     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 48     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 49     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 50     | 5-6 anos         | Manual  | ++  | +   | +   | ++  | N    | N         | AD      | N   | N       | N     |
| 12          | 51     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 52     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 53     | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 54     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | +   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 55     | 9-10 anos        | Manual  | -   | +++ | +   | ++  | N    | P         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 56     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 57     | Acima de 11 anos | Manual  | +++ | ++  | -   | +++ | P    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 58     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 59     | 6-7 anos         | Manual  | -   | TP  | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 60     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | 1:25(I) | N     |
| 12          | 61     | 5-6 anos         | Manual  | -   | ++  | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 62     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 63     | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | N   | 1:25(I) | N     |
| 12          | 64     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | +   | +   | P    | N         | PE      | N   | N       | N     |
| 12          | 65     | 5-6 anos         | Manual  | -   | ++  | -   | +   | N    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 66     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | AE      | N   | 1:50(I) | N     |
| 12          | 67     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PE      | P   | 1:400   | 1:400 |
| 12          | 68     | 3-4 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 69     | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -   | -   | N    | P         | AE      | N   | N       | N     |
| 12          | 70     | 7-8 anos         | Manual  | -   | -   | -   | ++  | P    | N         | PD      | N   | N       | N     |
| 12          | 71     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PE      | N   | N       | N     |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade                                    | Animal | Idade            | Ordenha | CMT |     |    |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL      | 2-ME  |
|------------------------------------------------|--------|------------------|---------|-----|-----|----|-----|------|-----------|---------|-----|----------|-------|
|                                                |        |                  |         | AE  | AD  | PE | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |          |       |
| 12                                             | 72     | 10-11 anos       | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | AE      | N   | 1:25(I)  | N     |
| 12                                             | 73     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | AD      | P   | 1:400    | 1:400 |
| 12                                             | 74     | 4-5 anos         | Manual  | -   | ++  | -  | +++ | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 75     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 76     | 4-5 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 77     | 9-10 anos        | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PD      | N   | 1:25     | N     |
| 12                                             | 78     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 79     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 80     | 8-9 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 81     | Acima de 11 anos | Manual  | -   | TP  | -  | TP  | P    | P         | PE      | N   | 1:25(I)  | N     |
| 12                                             | 82     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | TP | -   | P    | N         | AE      | P   | 1:100    | 1:100 |
| 12                                             | 83     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 84     | 5-6 anos         | Manual  | ++  | ++  | +  | +   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 85     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 86     | 4-5 anos         | Manual  | ++  | +++ | +  | +   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 87     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 88     | 9-10 anos        | Manual  | +   | +   | -  | -   | P    | P         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 89     | 5-6 anos         | Manual  | -   | +   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 90     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 91     | 3-4 anos         | Manual  | -   | ++  | -  | -   | P    | N         | PE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 92     | 5-6 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | PD      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 93     | 7-8 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:200(I) | 1:100 |
| 12                                             | 94     | 6-7 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 95     | 4-5 anos         | Manual  | ++  | +++ | ++ | ++  | P    | N         | AE      | N   | N        | N     |
| 12                                             | 96     | 7-8 anos         | Manual  | -   | -   | -  | -   | P    | P         | PE      | N   | 1:50(I)  | N     |
| Média de produção de leite = 5,2 litros/animal |        |                  |         |     |     |    |     |      |           |         |     |          |       |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 01:** Propriedade 13. Número e idade dos animais, tipo de ordenha, resultado do Califórnia Mastitis Test, Teste do Anel no latão, Teste do Anel individual, quarto sorteado para realização do Teste do Anel, Antígeno Tamponado Acidificado (ATA), Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) e média de produção de leite. Botucatu, 2003.

| Propriedade | Animal | Idade    | Ordenha  | CMT |    |     |    | TALL | TALI      |         | ATA | SAL    | 2-ME |
|-------------|--------|----------|----------|-----|----|-----|----|------|-----------|---------|-----|--------|------|
|             |        |          |          | AE  | AD | PE  | PD |      | Resultado | Sorteio |     |        |      |
| 13          | 1      | 5-6 anos | Mecânica | -   | +  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 2      | 3-4 anos | Mecânica | -   | -  | +   | +  | N    | N         | AE      | N   | N      | N    |
| 13          | 3      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N      | N    |
| 13          | 4      | 7-8 anos | Mecânica | -   | +  | +   | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 5      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | +   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 6      | 8-9 anos | Mecânica | -   | -  | +   | -  | N    | P         | PE      | N   | 1:50 I | N    |
| 13          | 7      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N      | N    |
| 13          | 8      | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 9      | 7-8 anos | Mecânica | -   | -  | +++ | -  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 10     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 11     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 12     | 8-9 anos | Mecânica | +   | TP | ++  | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 13     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 14     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 15     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -  | +   | -  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 16     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 17     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 18     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 19     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | +   | -  | N    | N         | PE      | P   | 1:50   | N    |
| 13          | 20     | 7-8 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PE      | N   | N      | N    |
| 13          | 21     | 4-5 anos | Mecânica | -   | -  | ++  | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 22     | 6-7 anos | Mecânica | +++ | -  | ++  | ++ | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 23     | 5-6 anos | Mecânica | +++ | +  | +   | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 24     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | +++ | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 25     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 26     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AE      | N   | N      | N    |
| 13          | 27     | 3-4 anos | Mecânica | -   | -  | ++  | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 28     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | ++  | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 29     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | +  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 30     | 6-7 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 31     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | -  | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |
| 13          | 32     | 8-9 anos | Mecânica | ++  | ++ | -   | -  | N    | P         | AD      | N   | N      | N    |
| 13          | 33     | 5-6 anos | Mecânica | -   | -  | -   | ++ | N    | N         | PD      | N   | N      | N    |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade | Animal | Idade      | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL  | 2-ME |
|-------------|--------|------------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|------|------|
|             |        |            |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |      |      |
| 13          | 34     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 35     | 5-6 anos   | Mecânica | +++ | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 36     | 4-5 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 37     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 38     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 39     | 5-6 anos   | Mecânica | +   | +   | +   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 40     | 7-8 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 41     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 42     | 6-7 anos   | Mecânica | ++  | -   | TP  | +   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 43     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | +   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 44     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | +   | +++ | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 45     | 4-5 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 46     | 5-6 anos   | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +++ | N    | P         | AD      | P   | 1:50 | N    |
| 13          | 47     | 6-7 anos   | Mecânica | +   | ++  | +   | ++  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 48     | 5-6 anos   | Mecânica | ++  | ++  | +++ | +   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 49     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | +++ | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 50     | 6-7 anos   | Mecânica | +++ | -   | +++ | +++ | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 51     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | +++ | ++  | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 52     | 4-5 anos   | Mecânica | -   | ++  | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 53     | 7-8 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | +++ | N    | P         | PD      | P   | 1:50 | N    |
| 13          | 54     | 4-5 anos   | Mecânica | +++ | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 55     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 56     | 7-8 anos   | Mecânica | +++ | +++ | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 57     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 58     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 59     | 4-5 anos   | Mecânica | -   | +++ | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 60     | 10-11 anos | Mecânica | -   | ++  | -   | +   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 61     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | +   | N    | N         | AD      | N   | N    | N    |
| 13          | 62     | 5-6 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 63     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 64     | 6-7 anos   | Mecânica | +   | -   | -   | ++  | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 65     | 4-5 anos   | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +++ | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 66     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 67     | 6-7 anos   | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 68     | 6-7 anos   | Mecânica | ++  | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |
| 13          | 69     | 5-6 anos   | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +++ | N    | N         | PE      | N   | N    | N    |
| 13          | 70     | 8-9 anos   | Mecânica | ++  | -   | ++  | +   | N    | N         | PD      | N   | N    | N    |
| 13          | 71     | 6-7 anos   | Mecânica | ++  | -   | -   | -   | N    | N         | AE      | N   | N    | N    |

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

| Propriedade | Animal | Idade     | Ordenha  | CMT |     |     |     | TALL | TALI      |         | ATA | SAL       | 2-ME |
|-------------|--------|-----------|----------|-----|-----|-----|-----|------|-----------|---------|-----|-----------|------|
|             |        |           |          | AE  | AD  | PE  | PD  |      | Resultado | Sorteio |     |           |      |
| 13          | 72     | 5-6 anos  | Mecânica | +++ | +++ | -   | +++ | N    | N         | PE      | N   | N         | N    |
| 13          | 73     | 6-7 anos  | Mecânica | +++ | +++ | +++ | +   | N    | N         | AD      | N   | N         | N    |
| 13          | 74     | 9-10 anos | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | P         | PE      | N   | N         | N    |
| 13          | 75     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | AD      | N   | N         | N    |
| 13          | 76     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | +   | +++ | N    | N         | PE      | N   | N         | N    |
| 13          | 77     | 6-7 anos  | Mecânica | +   | +   | +++ | +++ | N    | N         | PD      | N   | N         | N    |
| 13          | 78     | 3-4 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | +   | N    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 79     | 6-7 anos  | Mecânica | ++  | ++  | ++  | ++  | N    | N         | PE      | N   | N         | N    |
| 13          | 80     | 9-10 anos | Mecânica | TP  | ++  | +   | TP  | N    | N         | PE      | P   | 1:100(I)I | N    |
| 13          | 81     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | N    | N         | PE      | P   | 1:50      | N    |
| 13          | 82     | 5-6 anos  | Mecânica | +   | +   | ++  | +++ | N    | N         | PD      | N   | N         | N    |
| 13          | 83     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | +++ | +   | +++ | N    | N         | PE      | N   | N         | N    |
| 13          | 84     | 6-7 anos  | Mecânica | +   | +   | TP  | ++  | N    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 85     | 3-4 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | +   | N    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 86     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | ++  | ++  | P    | P         | PE      | N   | 1:25      | N    |
| 13          | 87     | 7-8 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | P         | PD      | P   | 1:50      | 1:25 |
| 13          | 88     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 89     | 5-6 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | PD      | N   | N         | N    |
| 13          | 90     | 6-7 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | +++ | P    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 91     | 4-5 anos  | Mecânica | -   | -   | -   | -   | P    | N         | AE      | N   | N         | N    |
| 13          | 92     | 6-7 anos  | Mecânica | +   | +++ | +++ | +++ | P    | N         | PE      | N   | N         | N    |

Média de produção de leite = 5,4 litros/animal

CMT = Califórnia Mastite Teste; AE = anterior esquerdo; AD = anterior direito; PE = posterior esquerdo; PD = posterior direito; TP = teto perdido; TALL = teste do anel no latão; TALI = teste do anel em amostrar individuais; ATA = antígeno acidificado tamponado; SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; N = negativo; P = positivo; (I) = incompleta.

**Anexo 02:** Resultados do Teste do Anel nos latões positivos e negativos. Número de identificação da propriedade, número de animais no latão, número dos animais positivos no latão, título do animal na Soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME). Botucatu, 2003.

|                                   | Nº PROPRIEDADE | Nº ANIMAIS NO LATÃO | Nº ANIMAIS POSITIVO NO LATÃO | TÍTULO DOS ANIMAIS |          |
|-----------------------------------|----------------|---------------------|------------------------------|--------------------|----------|
|                                   |                |                     |                              | SAL                | 2-ME     |
| LATÕES TESTE DO ANEL<br>POSITIVOS | <b>2</b>       | <b>7</b>            | <b>0</b>                     | <b>0</b>           | <b>0</b> |
|                                   | 3              | 10                  | 2                            | 1:50               | 1:50     |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:200    |
|                                   | 3              | 8                   | 1                            | 1:400              | 1:200    |
|                                   | 3              | 12                  | 2                            | 1:50               | 1:50     |
|                                   |                |                     |                              | 1:100(I)           | 1:50     |
|                                   | 4              | 11                  | 2                            | 1:200              | 1:200    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:200    |
|                                   | 4              | 6                   | 1                            | 1:200              | 1:100    |
|                                   | 6              | 19                  | 1                            | 1:200(I)           | 1:100    |
|                                   | 9              | 9                   | 2                            | 1:100              | 1:100    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:100    |
|                                   | 9              | 8                   | 1                            | 1:100              | 1:100(I) |
|                                   | 12             | 12                  | 1                            | 1:200(I)           | 1:100    |
|                                   | 12             | 12                  | 1                            | 1:100              | 1:100    |
|                                   | 12             | 11                  | 2                            | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
|                                   | 12             | 11                  | 2                            | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:100              | 1:100    |
|                                   | 12             | 10                  | 2                            | 1:200              | 1:200    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400(I) |
|                                   | 12             | 9                   | 4                            | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
|                                   | 12             | 8                   | 3                            | 1:200              | 1:200    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
|                                   |                |                     |                              | 1:400              | 1:400    |
| LATÕES TESTE DO ANEL<br>NEGATIVOS | 13             | 7                   | 1                            | 1:50               | 1:25     |
|                                   | 4              | 6                   | 1                            | 1:100              | 1:50     |
|                                   | 8              | 12                  | 2                            | 1:50               | 1:50     |
|                                   |                |                     |                              | 1:200              | 1:200    |
|                                   | 11             | 9                   | 1                            | 1:100              | 1:100    |

SAL = soroaglutinação lenta em tubos; 2-ME = 2-mercaptoetanol; (I) = incompleta.

**ANEXO 03: QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO****QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DE SANIDADE ANIMAL****I- Identificação da Propriedade**

Município: \_\_\_\_\_

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

Nome do Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço do Proprietário: \_\_\_\_\_

**II- Característica da Área**Fornecimento de Água:    ☐ Natural                      ☐ Artificial                      ☐ AmbasÁgua no Estábulo:            ☐ sim                              ☐ nãoÁgua na Mangueira:        ☐ sim                              ☐ nãoBebedouro:                    ☐ Natural                      ☐ Artificial                      ☐ AmbasNascedouro Água:        ☐ No local                      ☐ Fora                              ☐ Ambos

Água na Propriedade:

Rios:                              ☐ sim                              ☐ nãoCórregos:                      ☐ sim                              ☐ nãoLagos e Lagoas:            ☐ sim                              ☐ nãoAçudes:                        ☐ sim                              ☐ nãoReservatórios:              ☐ sim                              ☐ nãoNascentes ou Fontes:      ☐ sim                              ☐ não

Cocho (número): \_\_\_\_\_

(1) Coberto qtd \_\_\_\_\_

(2) Não Coberto qtd \_\_\_\_\_

Mangueira:                    ☐ sim                              ☐ nãoSala de ordenhas:          ☐ sim                              ☐ nãoPiquete maternidade:      ☐ sim                              ☐ não

**III- Dinâmica da População**

-Número total do rebanho bovino: \_\_\_\_\_

-Número total do rebanho bovino de leite: \_\_\_\_\_

-Número total de vacas leiteiras: \_\_\_\_\_

-Número de vacas em produção de leite: \_\_\_\_\_

Como é realizada a aquisição de animais?

( ) leilões ( ) exposições ( ) propriedades vizinhas ( )  
outras \_\_\_\_\_

Ao introduzir novos animais na propriedade:

-Usa quarentena? ( ) sim ( ) não

-Faz exame de brucelose e tuberculose? ( ) sim ( ) não

Raça Predominante:

-Holandês: ( ) sim ( ) não

-Jersey: ( ) sim ( ) não

-Girolando: ( ) sim ( ) não

-Zebu: ( ) sim ( ) não

Idade de Desmame: \_\_\_\_\_

**IV- Performance Sanitária**

Ocorrência de aborto? ( ) sim ( ) não

Qual o período de gestação: \_\_\_\_\_

Retenção de placenta: ( ) sim ( ) não ( ) sem registro

Destino do feto: \_\_\_\_\_

Existe nascimento de bezerros mortos ou debilitados? ( ) sim ( ) não

Problemas de parto? ( ) sim ( ) não

Os bezerros mamam o colostro? \_\_\_\_\_

Vacina contra aftosa?

( ) Sim ( ) Não

Vacina contra brucelose?

( ) Sim ( ) Não

Idade: \_\_\_\_\_

Outras vacinas?

( ) Sim ( ) Não

Quais?: \_\_\_\_\_

Teste brucelose:

( ) Sim ( ) Não

Limpeza do estábulo

( ) Não ( ) Água ( ) Seco

Nº de vezes ao dia: ( ) Menos de uma vez ( ) Uma vez ( ) Mais de 1 vez

Destino do material de limpeza do estábulo?

( ) Mecânica ( ) Esterqueira ( ) Tanque chorume

#### V - Performance Nutricional

Manejo: ( ) extensivo ( ) semi-extensivo ( ) intensivo

Manejo alimentar:

( ) pasto ( ) pasto + sal mineral ( ) pasto + ração

( ) pasto + ração + silagem ( ) ração + silagem ( ) feno

Mineralização:

Sal Grosso: ( ) Sim ( ) Não

Sal Mineral: ( ) Sim ( ) Não

Ambos: ( ) Sim ( ) Não

Questionário respondido por:

Nome: \_\_\_\_\_

Função: \_\_\_\_\_



NIELSEN, K.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; DUNCAN, J. R.; BUNDLE, D. R. Enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.50, p.5-9, 1989.

NIELSEN, K. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* O:9 or O:16 to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassays. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.24, p.373-382, 1990.

SZULOWSKI, K. Evaluation of the ELISA in diagnosis of bovine brucellosis. Part II - Examination of milk. **Polish J. Vet. Sci.**, Olsztyn, v.2, p.59-64, 1999.