

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE BRUCELOSE BOVINA ENTRE
REBANHOS FORNECEDORES DE LEITE DE UM
LATICÍNIO NO MUNICÍPIO DE ITIRAPUÃ, ESTADO DE
SÃO PAULO**

**Marina de Almeida Braga Medeiros
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE BRUCELOSE BOVINA ENTRE
REBANHOS FORNECEDORES DE LEITE DE UM
LATICÍNIO NO MUNICÍPIO DE ITIRAPUÃ, ESTADO DE
SÃO PAULO**

Marina de Almeida Braga Medeiros

**Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias
Coorientador: Prof. Dr. Lucif Abraão Nascif Junior**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária (Medicina
Veterinária Preventiva)**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2010**

M488p Medeiros, Marina de Almeida Braga
Prevalência de brucelose bovina entre rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no município de Itirapuã, Estado de São Paulo / Marina de Almeida Braga Medeiros. – – Jaboticabal, 2010
vii, 41 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Luis Antônio Mathias
Coorientador: Lucif Abraão Nascif Junior
Banca examinadora: Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, Fernanda Senter Magajevski
Bibliografia

1. Brucelose bovina. 2. antígeno acidificado tamponado. 3. fixação de complemento. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA DE ALMEIDA BRAGA MEDEIROS – nascida em Franca – SP, em 16 de dezembro de 1983, cursou ensino fundamental e médio na Fundação Educandário Pestalozzi, na cidade de Franca – SP. É Médica Veterinária formada pela Universidade de Franca – UNIFRAN, situada na cidade de Franca – SP, em dezembro de 2006, CRMV-SP nº 21.742. Em março de 2008 iniciou o Programa de Mestrado em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de Jaboticabal.

*Dedico este trabalho ao meu presente de
Deus, meu filho Fernando...*

*Nando, obrigada por você ser meu filho...
Você me faz a pessoa mais feliz do mundo...
Mamãe ama você mais que tudo!!!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela vida que tenho.

Aos meus pais, **José Márcio e Alcione**, por sempre terem me dado apoio, carinho, amor... Mãe, a senhora sabe que não foi fácil, mas eu consegui!!! Obrigada!!!

Ao meu filho **Fernando**, que por tantas horas teve de abrir mão da presença e da atenção da mãe para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu marido **Adriel**, por sempre ter me apoiado, mesmo em situações que exigiram muita confiança e paciência.

Ao meu Orientador, **Dr. Luis Antonio Mathias**, que é uma pessoa que aprendi a respeitar e admirar, não só como professor mais também como pessoa. Professor, obrigada por tudo!

Ao meu coorientador, **Dr. Lucif**, que desde a época da faculdade me aguenta e me ajuda. Lucif, hoje eu entendo...

Ao técnico **Nivaldo Aparecido Assis**, por ter colaborado na realização dos exames.

Aos estudantes **João Paulo e Wesley**, por terem me ajudado com a coleta, preparação do material a ser estudado e com a realização do teste do anel do leite.

A professora **Dra. Ângela**, pelo apoio de sempre e pela participação nas bancas de qualificação e defesa.

A professora **Dra. Glória**, pela participação na banca de qualificação.

A **Dra. Fernanda** pela participação na banca de defesa.

A minha prima **Flávia**, pela ajuda com a tradução.

Ao meu primo **Rafael** pela ajuda com a formatação.

A minhas **irmãs, meus cunhados e meus sobrinhos...**

A minha segunda mãe **Euripa**, por sempre estar presente nas mais diversas situações; olhando o meu filho, frequentando comigo a faculdade enquanto eu estava grávida, entre outras.

VOCÊS FORAM FUNDAMENTAIS PARA QUE ESTE TRABALHO FOSSE
REALIZADO!!!

OBRIGADA, DE CORAÇÃO!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURA	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Rebanhos analisados	10
4.2. Testes sorológicos	12
4.3. Análise dos dados	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Taxa de prevalência	15
5.2. Análise de fatores de risco	15
5.3. Comparação entre os resultados dos testes sorológicos utilizados	23
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS	35
9. APÊNDICE	41

LISTA DE FIGURA

	Página
1. Localização dos municípios de Itirapuã e Patrocínio Paulista, Estado de São Paulo, Brasil	10

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Prevalência de brucelose bovina em rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	15
2. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o município onde se localiza o rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	16
3. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o sexo, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	16
4. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de estarem ou não em lactação, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	17
5. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o número de animais do rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	18
6. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o uso ou não de vacina B19, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	18
7. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de exigir ou não exame de brucelose antes de introduzir o animal no rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	19
8. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de fazer ou não teste para diagnóstico de brucelose, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	19
9. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário comprar ou não animais frequentemente, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	20

10. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário frequentemente comprar ou não animais de vizinhos, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	21
11. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário frequentemente comprar ou não animais de outros proprietários que não são vizinhos, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	21
12. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário comprar ou não animais de leilão, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	22
13. Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário criar ou não outras espécies domésticas, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	22
14. Razão de prevalências (RP), intervalo de confiança (IC – 95%) da razão de prevalências e probabilidade de que a associação possa ser atribuída ao acaso (P), obtida por meio de teste exato de Fisher, de acordo com o fator analisado para a prevalência de brucelose em bovinos de rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	23
15. Distribuição dos resultados positivos observados no teste de antígeno acidificado tamponado (AAT) de acordo com os títulos observados na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico de brucelose entre animais de rebanhos de fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	24
16. Número de rebanhos distribuídos de acordo com os resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e os do teste do anel do leite (TAL) para diagnóstico de brucelose bovina entre os fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	25

17. Número de rebanhos distribuídos de acordo com os resultados da reação de fixação de complemento (RFC) e os do teste do anel do leite (TAL) para diagnóstico de brucelose bovina entre os fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007	26
--	----

**PREVALÊNCIA DE BRUCELOSE BOVINA ENTRE REBANHOS
FORNECEDORES DE LEITE DE UM LATICÍNIO NO MUNICÍPIO DE ITIRAPUÃ,
ESTADO DE SÃO PAULO**

RESUMO – O estudo teve por objetivo determinar a prevalência da brucelose bovina entre fornecedores de leite de um laticínio situado no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, analisar fatores de risco eventualmente associados à ocorrência de brucelose nos rebanhos estudados e analisar o desempenho de testes sorológicos para detectar a infecção. De uma população de 942 bovinos adultos distribuídos em 55 rebanhos, situados nos municípios de Itirapuã e de Patrocínio Paulista, foi obtida uma amostra voluntária composta por 813 animais, distribuídos em 37 rebanhos cujos proprietários aceitaram participar do estudo. Foi aplicado um questionário, para a obtenção de informações sobre fatores que pudessem estar associados às taxas de prevalência. Foram colhidas amostras de soro sanguíneo de todos animais, as quais foram submetidas ao teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), e as amostras positivas nesse teste foram submetidas à reação de fixação de complemento (RFC). Foram obtidas amostras de leite do conjunto de cada rebanho participante do estudo, que foram examinadas pelo teste do anel do leite (TAL). Das 813 amostras de soro sanguíneo colhidas, 26 (3,2%) resultaram positivas na aplicação em série dos testes de triagem (AAT) e confirmatório (RFC), e das 37 propriedades estudadas, 12 (32,4%) apresentaram pelo menos um animal positivo. Os fatores que se mostraram associados à ocorrência de brucelose foram número de animais no rebanho, não utilização da vacina B19 e compra frequente de animais. Não se observou boa concordância entre o TAL, que apontou resultado positivo em quatro (10,8%) dos 37 rebanhos, e os testes sorológicos individuais na detecção de rebanhos infectados.

Palavras-Chave: Brucelose bovina, antígeno acidificado tamponado, fixação de complemento, teste do anel do leite.

**PREVALENCE OF BOVINE BRUCELLOSIS AMONG MILK SUPPLIERS OF A
DAIRY INDUSTRY IN ITIRAPUÃ, STATE OF SÃO PAULO**

ABSTRACT – The aim of this investigation was to verify the prevalence of bovine brucellosis among milk suppliers of a dairy industry located in the municipality of Itirapuã, state of São Paulo, Brazil, analyze risk factors eventually associated with the occurrence of brucellosis among the herds involved in the study, and compare the performance of serological tests in detecting infected herds. From a population of 942 adult cattle in 55 herds, in the municipalities of Itirapuã and Patrocínio Paulista, a voluntary sample of 813 animals was obtained in 37 herds whose owners agreed in participating in the study. A questionnaire about risk factors that could be associated to the prevalence rates was applied. Serum samples of all the 813 animals were collected and tested by the rose Bengal plate test (RBPT); positive samples were then tested by the complement fixation test (CFT). Milk samples were taken from each can at the industry and tested by the milk ring test (MRT). Of the 813 serum samples, 26 (3.2) tested positive in the serial application of RBPT and CFT, and of the 37 herds, 12 (32.4%) had at least one positive animal. Factors that showed association with the prevalence rate were number of animals in the herd, lack of vaccination with strain 19 and frequent introduction of animals. The agreement between individual serological tests and MRT to detect infected herds was not good, since MRT showed positive results in only four (10.8%) of the 37 herds.

Keywords: Bovine brucellosis, rose Bengal plate, complement fixation, milk ring test.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade de grande importância econômica, pelo prejuízo que pode causar à criação de diversas espécies animais, além de seu agente etiológico ser patogênico para humanos, causando enfermidade que pode ser grave e de difícil tratamento.

Apesar de, há muito tempo, existirem conhecimentos e recursos técnicos para erradicar a brucelose animal, como já fizeram muitos países desenvolvidos, essa enfermidade ainda é endêmica na maior parte do Brasil (POESTER et al., 2002), causando prejuízos econômicos e expondo ao risco as pessoas que têm contato com animais ou seus produtos.

Diante dessa situação, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou, em janeiro de 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), voltado para bovinos e bubalinos, com o propósito de diminuir a prevalência da infecção e aumentar a oferta de produtos de baixo risco para a saúde pública (BRASIL, 2001; 2004).

Na sequência da criação do PNCEBT, a legislação que regulamenta a produção leiteira no Brasil estabeleceu que todos os rebanhos produtores de leite tipo A e os produtores de tipo B devem ser certificados livres de brucelose (BRASIL, 2002).

A preocupação com a saúde animal e com a saúde pública motiva o acompanhamento da situação epidemiológica da brucelose animal, mormente em

rebanhos produtores de leite, que pode ser um importante meio de transmissão para o ser humano. Sendo os animais os reservatórios do agente etiológico, a ocorrência da enfermidade humana depende da ocorrência nos animais. Daí a preocupação em realizar este estudo, que envolve fornecedores de leite de um laticínio situado em uma importante bacia leiteira do Estado de São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A importância da brucelose para a bovinocultura está associada a diversos aspectos, entre os quais se pode dar destaque a: queda na produtividade, ao risco de transmissão para o ser humano e perda de mercado em função de barreiras sanitárias.

As espécies do gênero *Brucella* estão associadas a hospedeiros específicos ou preferenciais: *B. abortus*, associada a bovinos, *B. suis*, a suínos, *B. melitensis*, a caprinos e ovinos, *B. ovis*, a ovinos, causando a epididimite dos carneiros, e *B. canis*, a caninos. Além dessas espécies, de maior importância, há outras, também associadas a hospedeiros silvestres terrestres e marinhos (SELEEM et al., 2010).

No que tange à bovinocultura leiteira, o risco de transmissão para o ser humano se reveste de importância ainda maior, pois, além da possibilidade de transmissão do agente por contato de caráter ocupacional, o agente etiológico pode chegar ao ser humano pela ingestão de leite de animais infectados, ou então pela ingestão dos derivados desse produto, como queijo, manteiga e muitos outros. Uma vez que no Brasil nunca foi constatada a presença de *Brucella melitensis* (POESTER et al., 2002), agente etiológico da brucelose caprina e, para humanos, o microrganismo mais patogênico desse gênero (WHO, 2006), a possibilidade de que a brucelose seja transmitida às pessoas pelo leite fica restrita ao produto bovino.

Também chamada mal de Bang, aborto enzoótico, aborto epizoótico ou aborto infeccioso dos bovinos (CARRILLO & LUCERO, 1993; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003), a brucelose bovina é uma enfermidade transmissível causada, geralmente, pela *Brucella abortus*, sendo o biovar 1 o mais comum, e distribuído em todo o mundo (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Em infecções naturais é difícil medir o período de incubação, porque não se pode determinar o momento da infecção. Experimentos mostram que o período de incubação é variável e inversamente proporcional ao período de gestação; quanto

mais adiantada a prenhez, menor o período de incubação (ACHA & SZYFRES, 2001).

O agente etiológico penetra no organismo do animal, multiplica-se inicialmente nos gânglios regionais e é levado pela linfa e pelo sangue a diferentes órgãos, quando então se instala naqueles pelos quais tem maior predileção. As localizações mais frequentes são gânglios linfáticos, útero, úbere, órgãos genitais dos machos, baço e fígado (ACHA & SZYFRES, 2001).

A *Brucella* tem especial predileção pelo útero da vaca gestante, o que parece estar associado à presença de grande quantidade de eritrol, um hidrato de carbono que estimula a multiplicação dessa bactéria. Isso pode explicar a ação patogênica da bactéria na placenta e no feto (ACHA & SZYFRES, 2001).

A enfermidade caracteriza-se por abortamentos nos estágios finais da gestação, natimortos e nascimento prematuro ou a termo de bezerros enfraquecidos, orquite e epididimite em machos e lesões articulares (XAVIER et al., 2009). Subsequentemente, observam-se altas taxas de infertilidade, causando perdas econômicas na produção bovina. Estima-se que a brucelose cause perdas de 20 a 25% na produção leiteira, devido aos abortos e aos problemas de fertilidade (RIBEIRO, 2000).

A brucelose humana também é conhecida como febre de Malta, febre ondulante ou febre do Mediterrâneo (CARRILLO & LUCERO, 1993; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). É uma doença febril, aguda ou subaguda, que provoca febre intermitente, mal-estar, anorexia e prostração e que, na ausência de tratamento específico, pode persistir por longo tempo, com graves consequências (WHO, 2006).

A capacidade de sobrevivência da *Brucella* em condições naturais é grande, quando comparada à de outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e em ambiente contendo matéria orgânica (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). A brucelose pode ser transmitida direta ou indiretamente do animal ao homem e, do ponto de vista de saúde pública, deve ser considerada não só como causa de enfermidade,

de incapacidade para o trabalho e de diminuição do rendimento mas também como fator nocivo para a produção de alimentos (PACHECO et al., 2008), uma vez que o agente etiológico é eliminado pelo leite (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Dado o impacto econômico na saúde animal e o risco de infecção humana, diversos países têm aplicado recursos para diagnóstico, controle e erradicação da brucelose (SILVA JÚNIOR et al., 2007).

Alguns países obtiveram êxito na erradicação da brucelose bovina, como Alemanha, Áustria, Bélgica, Bulgária, países da antiga Tchecoslováquia, Dinamarca, Finlândia, Hungria, Noruega, Holanda, Romênia, Suécia, Suíça, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, entre outros. No entanto, a enfermidade ainda ocorre na maior parte da América Latina, especialmente em países com grandes rebanhos bovinos, como Argentina, Brasil e México (ACHA & SZYFRES, 2001).

No Brasil, a infecção ocorre de forma endêmica em praticamente todo o país (POESTER et al., 2002; BRASIL, 2006b). Por isso, em 2001, foi aprovado 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 dessas enfermidades.

Segundo LAGE et al. (2008), um programa de controle e erradicação da brucelose bovina requer recursos humanos e financeiros, nem sempre disponíveis, por isso a prevenção com a vacinação assume um papel relevante. O programa brasileiro baseia-se principalmente em vacinação das bezerras com a amostra B19 de *B. abortus*, controle no trânsito e certificação de propriedades, porém essa certificação ainda é voluntária.

Além do programa, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu que todos os rebanhos produtores de leite tipo A e os produtores de leite B devem ser certificados livres de brucelose (BRASIL, 2002), mas esse dispositivo legal ainda não está sendo plenamente exigido dos produtores.

O conhecimento da taxa de prevalência de uma enfermidade é informação indispensável para o direcionamento de um programa de controle e erradicação

de uma enfermidade. No entanto o Brasil não é pródigo na disponibilidade desse tipo de informação. Até a criação do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), em 2001, havia apenas um levantamento de abrangência nacional e com metodologia estatística voltada para fornecer informação sobre a taxa de prevalência de brucelose (BRASIL, 1977).

Além de levantamentos de caráter local, ou informações compiladas a partir de exames de rotina feitos pelos veterinários de campo, novas informações a respeito da prevalência da brucelose viriam a ser obtidas apenas após a introdução do PNCEBT (BRASIL, 2006b). Essas informações mais recentes mostram uma taxa de prevalência de 3,8% de animais infectados e 9,7% de rebanhos com pelo menos um animal infectado no Estado de São Paulo (DIAS et al., 2009) e em Minas Gerais uma taxa de 1,1% de animais e de 6,0% de rebanhos (GONÇALVES et al., 2009).

Na região estudada há pouca informação a respeito da prevalência da brucelose bovina. MURAKAMI et al. (2003), em um estudo envolvendo os municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, observaram que, apesar de a prevalência de animais positivos para brucelose não ser tão alta (3,4%), a proporção de rebanhos infectados é mais elevada, 16,67%, ou seja, 22 dos 132 rebanhos testados apresentaram pelo menos um animal positivo.

Diversos fatores podem influir na taxa de prevalência de brucelose em uma população bovina. Esses fatores estão amplamente discutidos em trabalhos de revisão, como os de NICOLETTI (1980) e SALMAN e MEYER (1984). Entre esses fatores, encontram destaque aqueles relacionados ao manejo, como o número de animais do rebanho e a adoção de procedimentos sanitários adequados.

A maneira mais comum de entrada da brucelose em um rebanho é pela introdução de animais infectados e pela movimentação de animais sem o devido controle sanitário. É a maior causa de fracasso de programas de erradicação da brucelose (VAN WAVERN, 1960; NICOLETTI, 1980; RIBEIRO, 2000).

Juntamente com a introdução sem o devido controle, pode-se atribuir à compra frequente de animais um risco de ocorrência de brucelose, como foi

observado por KELLAR et al. (1976). Em rebanhos maiores, há mais probabilidade de infecção, maior dificuldade de eliminação (KELLAR et al., 1976; SALMAN & MAYER, 1984) e nesses rebanhos a reposição de animais é feita em maior escala, aumentando o risco de introdução de fontes de infecção.

No Brasil, DIAS et al. (2009), no Estado de São Paulo, e GONÇALVES et al. (2009), no Estado de Minas Gerais, também observaram que a compra frequente de animais pode ser um risco para a brucelose bovina, porém ambos afirmaram que o risco está na falta de cuidados sanitários na aquisição e não na compra propriamente dita.

O PNCEBT estabelece o diagnóstico da brucelose por meio de métodos indiretos, utilizando para isso o teste do anel do leite (TAL) para o monitoramento de estabelecimentos certificados como livres de brucelose e as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), soroaglutinação lenta mais 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) para o diagnóstico sorológico (BRASIL, 2001).

O programa adotou a aplicação do AAT como teste de triagem e a RFC ou a combinação SAT+ME para confirmação dos resultados positivos na triagem. O programa permite que o médico veterinário habilitado considere como infectado o animal que tiver resultado positivo somente no teste de triagem, sem precisar do teste confirmatório (BRASIL, 2004).

MEIRELLES-BARTOLI e MATHIAS (2009) verificaram que, caso o médico veterinário habilitado conclua o diagnóstico positivo com base apenas no teste de triagem, a probabilidade de acerto é grande.

Vários autores também confirmaram essa afirmação. MEGID et al. (2000) observaram que 93,4% dos resultados positivos no AAT também foram positivos no ME. KURODA et al. (2004) também encontraram 90,4% de concordância e verificaram a confirmação da positividade em 88% das amostras analisadas. GREVE et al. (2007) confirmaram a positividade em 88% dos soros.

Embora o PNCEBT tenha adotado o TAL como ferramenta de vigilância epidemiológica, na detecção de rebanhos infectados, pela análise de amostras de

leite de um grupo de animais, esse teste não vem sendo bastante utilizado. Nos últimos anos, poucas investigações envolvendo esse teste foram realizadas no Brasil ou em outros países. Na literatura brasileira, são encontradas pesquisas avaliando a capacidade do TAL para detectar rebanhos infectados, em comparação com testes efetuados no soro sanguíneo, e também estudos comparando os testes sorológicos com soro sanguíneo com o teste do anel no leite individual dos animais, porém o PNCEBT não prevê esse uso (BRASIL, 2004; BRASIL, 2006a).

ACYPRESTE et al. (2002) compararam os resultados do TAL aos resultados do AAT, assim como GONZÁLES TOMÉ e SAMARTINO (1997); segundo eles, o TAL não é o procedimento mais adequado para examinar rebanhos. SILVA JÚNIOR et al. (2007) encontraram entre os rebanhos com animais negativos no teste individual amostra positiva no TAL. BONETTI et al. (1994), em Uruguaiana, RS, também encontraram resultados negativos no AAT e positivos no TAL. SILVA et al. (2002) observaram que o TAL apresentou melhor concordância com o teste do mercaptoetanol do que com a soroaglutinação rápida.

Segundo BRINLEY MORGAN (1967), diversos fatores podem provocar a ocorrência de resultados errados no teste, entre eles a presença de animais com mastite, que pode induzir reações falso-positivas no TAL.

3. OBJETIVOS

O estudo teve por objetivo:

- determinar a prevalência da brucelose bovina entre fornecedores de leite de um laticínio situado no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo;
- analisar fatores de risco eventualmente associados à ocorrência de brucelose nos rebanhos estudados;
- avaliar o teste do anel do leite, aplicado ao leite do conjunto de cada rebanho fornecedor, em comparação com o resultado dos testes sorológicos realizados individualmente no soro sanguíneo dos animais adultos que fazem parte do rebanho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Rebanhos analisados

Esta investigação envolveu rebanhos bovinos fornecedores de leite de um laticínio situado no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo. Esse laticínio recebia leite de rebanhos dos municípios de Itirapuã e de Patrocínio Paulista, localizados na região Nordeste do Estado de São Paulo. O Município de Itirapuã localiza-se a 20° 38' 27" de latitude sul e 47° 13' 09" de longitude oeste, com uma altitude de 865 metros e uma área de 161,9 Km², e Patrocínio Paulista localiza-se a 20° 38' 22" de latitude sul e 47° 16' 54" de longitude oeste, com uma altitude de 743 metros e uma área de 601,7 Km² (Figura 1).



Figura 1 - Localização dos municípios de Itirapuã e Patrocínio Paulista, Estado de São Paulo, Brasil.

O Município de Itirapuã possui um rebanho bovino de 11.098 animais, e Patrocínio Paulista, 29.137 animais. A produção total de leite no Município de Itirapuã, em 2008, foi de 3.050.000 litros, enquanto em Patrocínio Paulista essa produção foi de 13.359.000 litros (IBGE, 2009).

O laticínio recebia diariamente uma média de 3.200 litros de leite, dos quais, aproximadamente, 2.500 litros eram pasteurizados e vendidos como leite tipo C e o restante era utilizado na produção de queijo tipo muçarela.

A população-alvo do presente estudo consistiu de todos os animais com idade igual ou superior a 24 meses dos rebanhos bovinos que forneciam leite para esse laticínio, entre os quais se buscou obter uma amostra não probabilística voluntária.

O número de fornecedores do laticínio era de 55 rebanhos, que somavam 942 animais. Os proprietários de 37 dos rebanhos aceitaram participar do estudo, somando então 813 animais, sendo 22 propriedades de Itirapuã e 15 propriedades de Patrocínio Paulista. Nos rebanhos cujos proprietários não concordaram em participar do estudo, foram examinadas apenas amostras do leite de conjunto que era recebido no laticínio. Nos rebanhos que participaram do estudo, foram colhidas amostras de sangue de todos os bovinos com idade igual ou superior a 24 meses, em um total de 792 fêmeas e 21 machos, além de amostras de leite de conjunto, no laticínio. Essas colheitas ocorreram no primeiro semestre de 2007.

O sangue foi colhido, por punção na veia jugular, em frascos de vidro estéreis, sem anticoagulante. Esses frascos foram mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente e depois refrigerados. Após a retração do coágulo, o material foi centrifugado, o soro sanguíneo foi separado, colocado em microtubos de 1,5 mL e mantido à temperatura de -20°C até o momento de realização dos testes.

Foi colhida uma amostra de leite por latão de 50 litros, totalizando 56 amostras nos 37 rebanhos. Após homogeneização, uma alíquota de leite de aproximadamente 20 mL era colhida em frasco estéril e mantida sob refrigeração.

Para verificar a associação de fatores de risco com a ocorrência de brucelose, foi elaborado um questionário o qual foi respondido por cada um dos fornecedores que concordaram em participar do estudo.

4.2. Testes sorológicos

O soro sanguíneo de todos os animais amostrados foi inicialmente submetido ao teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), realizado no Laboratório de Diagnóstico de Brucelose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Campus de Jaboticabal – SP, conforme descrito no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006a), consistindo, brevemente, em misturar, em uma placa de vidro, 30 µL de soro e 30 µL de antígeno acidificado corado com rosa de Bengala, homogeneizar, aguardar 4 minutos sob agitação e observar a ocorrência ou não de aglutinação. O antígeno usado foi preparado com *Brucella abortus* pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Aqueles com resultado positivo no teste de triagem (AAT) foram submetidos à reação de fixação de complemento (RFC), usada como teste confirmatório, conforme prevê o PNCEBT. Para a RFC, foi usada a microtécnica 50% de hemólise, com incubação a 37°C nas duas fases da incubação, conforme descrevem ALTON et al. (1988).

Utilizou-se o mesmo antígeno empregado no teste de soroaglutinação lenta em tubos. A diluição do antígeno foi determinada por titulação em bloco, escolhendo-se como diluição a metade da diluição de reatividade ótima.

Como complemento foi usada uma mistura de soros sanguíneos de várias cobaias. Esse complemento foi titulado como descrito por ALTON et al. (1988), usando 20 vezes o volume empregado na microtécnica, para determinar o volume que continha uma unidade hemolítica 50%. Para uso no teste, o complemento era diluído de modo a conter 5 unidades hemolíticas 50%.

O sistema hemolítico consistiu de suspensão de hemácias de carneiro, padronizada em espectrofotômetro para a concentração de 0,95 g de hemoglobina por 100 mL, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que

consiste de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro (ALTON et al., 1988).

O teste, realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”, consistiu em colocar 25 µL de soro, inativado em banho-maria a 58°C por 30 minutos, em diluições duplas, de 1/2 até 1/128, 25 µL de antígeno e 25 µL de complemento e incubar em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 25 µL do sistema hemolítico, e, após agitação em agitador de microplacas, o material foi novamente incubado nas condições mencionadas acima. Imediatamente após a incubação as placas foram colocadas na geladeira, para interromper a ação do complemento, sendo em seguida centrifugadas a 1.500 rpm por 5 a 10 minutos. O próximo passo consistiu em realizar a leitura, comparando com uma escala de hemólise, observando-se o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante.

O título foi obtido pela recíproca da maior diluição do soro com pelo menos 25% de fixação de complemento, sendo considerado positivo o soro com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4 (ALTON et al., 1988). Foi considerado infectado o rebanho com pelo menos um animal com resultado positivo na reação de fixação de complemento.

As amostras de leite, após conservação por 24 horas a 5°C, foram submetidas ao teste do anel do leite (TAL), realizado no laboratório da Universidade de Franca, executado conforme descreve o Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006a). O teste consistiu em colocar, em um tubo de vidro de 10 mm por 75 mm, 1 mL da amostra de leite e 30 µL do antígeno. Após homogeneização, o material foi incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por hora, sendo então feita a leitura, que consistiu na observação da formação de um anel de cor azul na parte superior da mistura, com a coluna em cor branca, caracterizando reação positiva; a formação de um anel branco na parte superior, com coluna azul, caracterizou a ausência de reação. O rebanho

com mais de um latão de leite (mais de uma amostra) era considerado infectado quando apresentava resultado positivo em pelo menos uma amostra.

4.3. Análise dos dados

A prevalência verdadeira foi estimada com base na prevalência aparente, ou seja, aquela obtida por meio do diagnóstico sorológico, empregando a seguinte fórmula (DOHOO et al., 2003):

$$PV = \frac{PA - (1 - E)}{1 - [(1 - E) + (1 - S)]}$$

em que PV = prevalência verdadeira;

PA = prevalência aparente;

E = especificidade;

S = sensibilidade.

Considerou-se, para o protocolo de testes em série adotado, uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 99,5%, conforme adotaram DIAS et al. (2009).

Para verificar a associação entre os fatores analisados e a prevalência de brucelose foi usada análise univariada. Para tanto, foi calculada a razão de prevalências, com determinação do intervalo de confiança com 95% de probabilidade (SCHWABE et al., 1977). Também foi determinada a significância estatística, com base no teste exato de Fisher, cujos cálculos foram efetuados usando planilha eletrônica disponível no site www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html. Adotou-se como significante a probabilidade igual ou superior a 95% de que a associação observada fosse devida ao acaso.

A comparação entre os resultados dos testes sorológicos baseou-se na concordância, obtida por meio do indicador Kappa (LANDIS & KOCH, 1977).

5. RESULTADOS

5.1. Taxa de prevalência

Dos 55 fornecedores de leite do laticínio envolvido no estudo, 37, ou seja, 67,3%, concordaram em participar, e, com isso, 813 (86,3%) dos 942 animais adultos que compunham a população bovina alvo da pesquisa foram examinados (Tabela 1).

Os testes de brucelose revelaram que, dos 813 animais examinados, 26 apresentaram reação positiva na aplicação sequencial dos testes AAT e RFC, significando uma taxa de prevalência aparente de 3,2%. (Tabela 1). Levando em consideração a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico sorológico, a prevalência verdadeira foi estimada em 2,9% de animais infectados.

Entre os 37 rebanhos estudados, constatou-se que 12 possuíam pelo menos um animal com resultado positivo no diagnóstico sorológico, o que resulta em uma prevalência de focos de 32,4% (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de brucelose bovina em rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

	Existentes	Examinados	Positivos		Negativos	
			Número	%	Número	%
Animais	942	813	26	3,2	787	96,8
Rebanhos	55	37	12	32,4	25	67,6

5.2. Análise de fatores de risco

Comparando as taxas de prevalência de animais com diagnóstico sorológico positivo para brucelose observadas nos dois municípios onde se localizavam os rebanhos fornecedores de leite, constata-se que em Patrocínio Paulista 4,5% dos

animais eram reagentes, e em Itirapuã 2,5% tiveram diagnóstico positivo (Tabela 2). A razão de prevalências entre essas duas taxas foi de 1,79, e o intervalo de confiança foi de 0,84 a 3,81. A probabilidade de tal diferença dever-se ao acaso foi de 5,1% (Tabela 14).

Tabela 2 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o município onde se localiza o rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Município	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Patrocínio Paulista	13	4,5	278	95,5	291 (100%)
Itirapuã	13	2,5	509	97,5	522 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

A frequência de reagentes entre as fêmeas examinadas foi de 3,3%, ao passo que entre os 21 touros examinados não se encontrou nenhum animal com resultado positivo (Tabela 3). Com isso, não foi possível calcular a razão de prevalências, mas o teste exato de Fisher indicou que a diferença observada não tem significância estatística (Tabela 14), uma vez que a probabilidade de tal diferença ser devida ao acaso foi de 50,1%.

Tabela 3 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o sexo, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Sexo do animal	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Fêmea	26	3,3	766	96,7	792 (100%)
Macho	0	0,0	21	100,0	21 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

De 298 fêmeas que não estavam em lactação, 13 (4,3%) apresentaram resultado positivo, e entre as fêmeas lactantes a prevalência aparente observada foi de 2,6%, conforme se observa na Tabela 4. A razão entre essas duas taxas de prevalência foi de 1,66, com intervalo de confiança (95%) variando de 0,78 a 3,53 e diferença não significativa ($P = 0,067$) pelo teste exato de Fisher (Tabela 14).

Tabela 4 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de estarem ou não em lactação, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Lactação	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Não	13	4,3	285	95,7	298 (100%)
Sim	13	2,6	481	97,4	494 (100%)
Total	26	3,3	766	96,7	792 (100%)

A análise das taxas de prevalência de brucelose bovina de acordo com o tamanho do rebanho mostrou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,011$). Nos rebanhos que possuíam até 30 animais, observou-se que 4,6% deles eram positivos, enquanto nos rebanhos com mais de 31 animais essa proporção foi de 1,6% (Tabela 5). A razão de prevalências foi de 2,9, com intervalo de confiança de 1,78 a 4,72 (Tabela 14).

Tabela 5 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o número de animais do rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Número de animais do rebanho	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
1 a 30	20	4,6	415	95,4	435 (100%)
≥ 31	6	1,6	372	98,4	378 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

A frequência de animais reagentes nos rebanhos cujos proprietários declararam não usar a vacina B19 foi de 3,8%, ao passo que entre aqueles que declaram usar essa vacina a frequência de positivos foi de 0,7% (Tabela 6), resultando em razão de prevalências de 5,66 (intervalo 95% de 0,77 a 41,44) e diferença estatisticamente significativa pelo teste exato de Fisher ($P = 0,032$), conforme se vê na Tabela 14.

Tabela 6 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o uso ou não de vacina B19, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Uso de vacina B19	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Não	25	3,8	638	96,2	663 (100%)
Sim	1	0,7	149	99,3	150 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Nos rebanhos cujos proprietários afirmaram não exigir teste de brucelose antes de introduzir animais, a frequência de reagentes foi de 3,7%, e entre os animais daqueles que afirmaram exigir exame, a taxa foi de 0,7% (Tabela 7). A

razão de prevalências foi calculada em 5,4, e o intervalo de confiança foi de 0,74 a 39,53 (Tabela 14), com diferença estatisticamente significativa ($P = 0,038$).

Tabela 7 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de exigir ou não exame de brucelose antes de introduzir animal no rebanho, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Exigência de teste de brucelose	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Não	25	3,7	643	96,3	668 (100%)
Sim	1	0,7	144	99,3	145 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Observou-se uma taxa de prevalência de 4,2% de animais reagentes entre aqueles cujos proprietários declaram realizar teste de brucelose para controle da enfermidade. Entre os animais cujos proprietários declararam não realizar teste, a taxa de prevalência foi de 2,3% (Tabela 8). A razão entre essas duas taxas foi de 1,81 (0,83 - 3,94), e a diferença entre ambas não foi significativa, uma vez que P foi igual a 0,093 (Tabela 14).

Tabela 8 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de fazer ou não teste para diagnóstico de brucelose, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Teste brucelose	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	16	4,2	365	95,8	381 (100%)
Não	10	2,3	422	97,7	432 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Nos rebanhos em que os proprietários afirmaram comprar animais frequentemente, observou-se taxa de prevalência de 4,4%, e nos rebanhos daqueles que não compravam animais frequentemente essa taxa foi de 1,5% (Tabela 9). A razão de prevalências foi de 2,85, com intervalo de confiança de 1,09 a 7,48 (Tabela 14) e diferença estatisticamente significativa ($P = 0,018$).

Tabela 9 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário comprar ou não animais frequentemente, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Compra frequente de animais	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	21	4,4	463	95,6	484 (100%)
Não	5	1,5	324	98,5	329 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Entre os rebanhos cujos proprietários compravam animais de vizinhos, a taxa de prevalência foi de 5,2%, e entre aqueles cujos proprietários afirmaram não comprar a taxa foi de 2,0% (Tabela 10). Isso significa uma razão de prevalências de 2,64, sendo o intervalo de confiança de 1,21 a 5,74 (Tabela 14). A diferença entre essas taxas foi significativa pelo teste exato de Fisher ($P = 0,011$).

Tabela 10 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário frequentemente comprar ou não animais de vizinhos, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Compra de vizinhos	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	16	5,2	291	94,8	307 (100%)
Não	10	2,0	496	98,0	506 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

A taxa de prevalência entre os animais cujos proprietários declaram comprar animais de propriedades que não são vizinhas foi de 4,8%, em comparação com 1,3% entre aqueles cujos proprietários declaram não comprar (Tabela 11). A razão de prevalências resultou em 3,56, e o intervalo de confiança variou de 1,36 a 9,35 (Tabela 14). A diferença entre essas duas taxas revelou-se significativa, com probabilidade de apenas 0,4% de que possa ser devida ao acaso.

Tabela 11 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário frequentemente comprar ou não animais de outros proprietários que não são vizinhos, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Compra de não vizinhos	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	21	4,8	419	95,2	440 (100%)
Não	5	1,3	368	98,7	373 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Entre os 54 animais cujos proprietários afirmaram comprar em leilões de bovinos, observou-se taxa de 7,4% de animais positivos, ao passo que entre os 759 animais de proprietários que não compravam em leilões a taxa foi de 2,9%

(Tabela 12). Isso resulta em razão de prevalências de 2,56, intervalo de confiança de 0,91 a 7,16 e diferença não significativa ($P = 0,063$) (Tabela 14).

Tabela 12 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário comprar ou não animais de leilão, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Compra em leilão	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	4	7,4	50	92,6	54 (100%)
Não	22	2,9	737	97,1	759 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Não se observou nenhum animal reagente entre aqueles localizados em propriedades onde se criam apenas bovinos, enquanto entre os animais de propriedades onde são criadas outras espécies foi observada taxa de prevalência de 3,5% (Tabela 13). Isso não permite calcular a razão de prevalências, mas a diferença entre essas duas situações revelou-se não significativa, com 13,2% de probabilidade de que possa ser atribuída ao acaso (Tabela 14).

Tabela 13 - Prevalência de animais com brucelose bovina, de acordo com o fato de o proprietário criar ou não outras espécies domésticas, entre fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Cria outras espécies domésticas	Brucelose				Total
	Sim		Não		
	Nº	%	Nº	%	
Sim	26	3,5	727	96,5	753 (100%)
Não	0	0	60	100	60 (100%)
Total	26	3,2	787	96,8	813 (100%)

Tabela 14 – Razão de prevalências (RP), intervalo de confiança (IC - 95%) da razão de prevalências e probabilidade de que a associação possa ser atribuída ao acaso (P), obtida por meio do teste exato de Fisher, de acordo com o fator analisado para a prevalência de brucelose em bovinos de rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

Fator analisado	Tabela	RP	IC (95%)	P
Município	2	1,79	0,84 – 3,81	0,051
Sexo	3	-----	-----	0,501
Lactação	4	1,66	0,78 – 3,53	0,067
Número de animais no rebanho	5	2,90	1,78 – 4,72	0,011
Uso da vacina B19	6	5,66	0,77 – 41,44	0,032
Exigência de teste de brucelose	7	5,40	0,74 – 39,53	0,038
Teste de brucelose	8	1,81	0,83 – 3,94	0,093
Compra animais frequentemente	9	2,85	1,09 – 7,48	0,018
Compra de vizinhos	10	2,64	1,21 – 5,74	0,011
Compra de não vizinhos	11	3,56	1,36 – 9,35	0,004
Compra em leilão	12	2,56	0,91 – 7,16	0,063
Cria outras espécies	13	-----	-----	0,132

5.3. Comparação entre os resultados dos testes sorológicos utilizados

Dos 813 animais examinados, 41 (5,0%) apresentaram resultado positivo no teste de triagem, ou seja, no teste do antígeno acidificado tamponado, e 772 apresentaram resultado negativo. Dos 41 soros positivos na triagem, 14 não apresentaram título no teste confirmatório, ou seja, na reação de fixação de complemento, 1 apresentou título 2, 4 apresentaram título 4, 5 apresentaram título 8, 4 apresentaram título 16, 9 apresentaram título 32, 2 apresentaram título 64 e dois apresentaram título igual ou superior a 128, conforme se pode ver na Tabela 15. Adotando o título 4 como ponto de corte, verifica-se que 26 (63,4%) dos 41

resultados positivos na triagem foram confirmados pela reação de fixação de complemento.

Tabela 15 – Distribuição dos resultados positivos observados no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) de acordo com os títulos observados na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico de brucelose entre animais de rebanhos fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

RFC	Positivo no AAT
-	14
2	1
4	4
8	5
16	4
32	9
64	2
≥128	2
Total	41

O teste do anel do leite apresentou resultado positivo em apenas 4 (10,8%) dos 37 rebanhos que participaram do estudo (Tabelas 16 e 17). Dos outros 18 rebanhos, 4 (22,2%) apresentaram resultado positivo. Isso significa um total geral de 8 rebanhos (14,5%) entre os 55 fornecedores considerados infectados com base no TAL.

Quando se compara a capacidade do teste do anel do leite de proporcionar um resultado positivo com a capacidade do teste do antígeno acidificado tamponado de apontar pelo menos um animal com resultado positivo no mesmo rebanho, nota-se que, de 16 rebanhos em que o AAT encontrou pelo menos um positivo, o TAL apresentou resultado positivo em apenas 4 (25,0%), e em todos os rebanhos em que o AAT não encontrou animal reagente o TAL apresentou

resultado negativo. Isso significa que o TAL apontou 10,8% de rebanhos infectados, enquanto o AAT apontou 43,2%, ou seja, 16 rebanhos com pelo menos um animal reagente em 37 rebanhos estudados, conforme mostra a Tabela 16. A comparação entre os resultados dos dois testes proporciona indicador kappa de 0,27, significando concordância fraca.

Tabela 16 – Número de rebanhos distribuídos de acordo com os resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e os do teste do anel do leite (TAL) para diagnóstico de brucelose bovina entre os fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

TAL	AAT		Total
	Pelo menos 1 animal positivo	Nenhum animal positivo	
Positivo	4	0	4
Negativo	12	21	33
Total	16	21	37

K = 0,27

A utilização em série do AAT com a RFC apontou a existência de pelo menos um animal reagente em 12 (32,4%) dos 37 rebanhos (Tabela 17). Comparando esses resultados com os do TAL, obteve-se um indicador kappa de 0,40, indicando que esse teste apresentou maior concordância com a série AAT-RFC do que com o teste de triagem apenas.

Tabela 17 – Número de rebanhos distribuídos de acordo com os resultados da reação de fixação de complemento (RFC) e os do teste do anel do leite (TAL) para diagnóstico de brucelose bovina entre os fornecedores de leite de um laticínio no Município de Itirapuã, Estado de São Paulo, 2007.

TAL	AAT + RFC (em série)		Total
	Pelo menos 1 animal positivo	Nenhum animal positivo	
Positivo	4	0	4
Negativo	8	25	33
Total	12	25	37

K = 0,40

6. DISCUSSÃO

Levantamento realizado na década de 1970 (BRASIL, 1977) revelou uma taxa de prevalência de brucelose de 7,5% de animais reagentes na Região Sudeste. No Estado de São Paulo, observou-se que 22,7% das propriedades tinham animais infectados e que 7,4% das fêmeas examinadas foram reagentes. Em Minas Gerais, o mesmo estudo indicava 17,7% de rebanhos com animais positivos e 6,3% de fêmeas reagentes.

O longo tempo transcorrido e a diferença de metodologia empregada dificultam a comparação com os dados observados na presente investigação, que revelou uma prevalência aparente de 3,2% e uma prevalência verdadeira estimada em 2,9%. A prevalência de focos, ou seja, rebanhos com pelo menos um animal com diagnóstico positivo, foi de 32,4%.

Outro levantamento sorológico realizado na mesma região, nos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, usando metodologia semelhante à deste estudo, encontrou 3,15% de animais reagentes e 16,67% de rebanhos com pelo menos um animal reagente (MURAKAMI et al., 2003). Essa comparação mostra uma situação muito parecida quanto à porcentagem de animais reagentes, porém diferente quanto à prevalência de focos, uma vez que o presente estudo encontrou metade da proporção de rebanhos infectados observada naquele outro estudo em municípios vizinhos.

As informações obtidas também podem ser comparadas com aquelas do levantamento realizado para o PNCEBT. No Estado de São Paulo, a prevalência de animais foi estimada em 3,8%, enquanto a prevalência de focos foi de 9,7%. Mais especificamente na região em que se encontra a população abrangida pelo presente estudo (circuito produtor 4), foi observada uma prevalência de animais de 5,52%, superior à observada neste estudo, e uma prevalência de focos de 11,11%; a prevalência de focos em rebanhos produtores de leite foi de 17,4% (DIAS et al., 2009). Essas prevalências de foco foram inferiores à observada no presente estudo. Pela comparação entre os dados nota-se ainda que, embora a

prevalência de animais reagentes na população estudada tenha sido inferior, a brucelose estaria mais disseminada, uma vez que praticamente um terço dos rebanhos teve pelo menos um animal com diagnóstico positivo.

Também é interessante comparar os dados obtidos com aqueles observados em Minas Gerais, Estado com o qual a região estudada faz fronteira. GONÇALVES et al. (2009) relataram para Minas Gerais uma prevalência de 1,1% de animais infectados e 6,0% de focos. Na região de Minas que faz fronteira com a área do rebanho estudado (Sul e Sudoeste), a prevalência de animais foi de 0,4%, a mais baixa de todo o Estado, e a prevalência de focos foi de 3,8%, também a mais baixa do Estado; a prevalência de focos em rebanhos leiteiros foi de 3,59% nessa região. Pela comparação, nota-se que a prevalência em Minas Gerais é bem mais baixa que a do rebanho estudado, assim como é mais baixa que a do Estado de São Paulo, de um modo geral. Essa situação certamente tem relação com o fato de Minas Gerais ter começado um programa de vacinação obrigatória das bezerras com *Brucella abortus* B19 já em meados da década de 1990, vários anos antes do programa nacional, confirmando a importância da vacinação na diminuição da taxa de prevalência da brucelose bovina.

A comparação entre a porcentagem de reagentes nos dois municípios que tinham rebanhos fazendo parte da população-alvo não apontou diferença significativa, embora estivesse próxima disso ($P = 0,051$).

Apesar de ter sido observado que 3,3% das fêmeas examinadas tinham anticorpos contra *Brucella* e que nenhum macho reagente tenha sido encontrado, a comparação entre sexos não indicou diferença significativa. Talvez essa ausência de significância possa estar relacionada ao baixo número de touros examinados, uma vez que as vacas, principalmente aquelas em gestação, constituem a categoria mais susceptível à brucelose bovina (NICOLETTI, 1980; ACHA & SZYFRES, 2001).

A comparação entre as porcentagens de reagentes em vacas em lactação e em vacas secas também não apontou diferença significativa, apesar da taxa um pouco maior em vacas secas, o que poderia encontrar explicação no fato de a

brucelose ser uma enfermidade da esfera reprodutiva, o que se reflete no fato de o animal estar ou não em lactação.

A frequência de animais reagentes em propriedades que exigem teste de brucelose antes de introduzir animais, medida inquestionavelmente útil para evitar que a infecção seja introduzida no rebanho, foi inferior (0,7%) à frequência em rebanhos que não exigem (3,7%), porém a análise estatística não apontou diferença significativa, provavelmente pelo pequeno número de produtores que fazem essa exigência.

A realização de testes para diagnóstico de brucelose também não revelou influência significativa na porcentagem de animais reagentes.

A análise realizada neste estudo indicou associação significativa entre a frequência de animais reagentes e os seguintes fatores: número de animais no rebanho, não vacinação com a amostra B19 e compra frequente de animais.

Observou-se menor porcentagem de reagentes entre animais de rebanhos compostos por pelo menos 31 animais (1,6%), em relação àqueles com até 30 (4,6%). Esses dados contrariam informações encontradas na literatura, as quais mostram que em rebanhos maiores há maior probabilidade de infecção, prevalência mais elevada e maior dificuldade de eliminar a infecção (KELLAR et al., 1976; NICOLETTI, 1980; SALMAN & MEYER, 1984). De acordo com NICOLETTI (1980), o aumento no tamanho do rebanho usualmente é acompanhado de aumento na densidade de animais, e isso aumenta o risco de contato entre o animal susceptível e a fonte de infecção. A associação entre rebanhos maiores e frequência de animais infectados também foi observada no Estado de São Paulo. Segundo DIAS et al. (2009), tamanho de rebanho igual ou acima de 87 animais mostrou-se um fator associado à taxa de prevalência. No entanto os resultados do presente trabalho não confirmaram as observações desses autores, talvez porque a população estudada seja composta, na sua grande maioria, por rebanhos bastantes pequenos, e o número de animais adotado para separar os dois grupos foi também pequeno (31), quando

comparado, por exemplo, ao número de 87 animais adotado por DIAS et al. (2009).

A vacinação das bezerras conforme estabelecem as normas do PNCEBT é um fator que contribui para a redução nas taxas de prevalência de brucelose, e os dados do presente trabalho também apontam nesse sentido. Em rebanhos que não adotavam a vacinação com a amostra B19, a porcentagem de animais reagentes foi de 3,8%, significativamente superior à taxa de 0,7% observada entre os rebanhos que adotavam a vacinação. Essa observação também foi feita por KELLAR et al. (1976), que, em um estudo de casos-controles (o presente estudo é do tipo seccional, ou transversal, também chamado estudo de prevalência) realizado no Canadá, verificaram menor frequência de vacinação em rebanhos infectados. Também no Brasil, em Minas Gerais, foi observada menor frequência de focos de brucelose entre rebanhos que vacinavam com a amostra B 19 (GONÇALVES et al., 2009). Isso tudo confirma a utilidade da vacinação e a importância de dar ênfase a essa medida sanitária, com o objetivo de baixar significativamente a taxa de prevalência de brucelose bovina no país.

A maneira mais comum de entrada da *Brucella abortus* em um rebanho é pela introdução de animais infectados. A introdução de animais sem o devido controle sanitário tem sido apontada como fator importante por diversos autores (VAN WAVERN, 1960; NICOLETTI, 1980). KELLAR et al. (1976) também observaram maior risco de ocorrência de brucelose em rebanhos cujos proprietários fazem compras frequentes de animais. No Brasil, a importância desse fator também já foi verificada por DIAS et al. (2009), no Estado de São Paulo, e por GONÇALVES et al. (2009), no Estado de Minas Gerais. Esses autores enfatizaram que o risco de introdução da infecção não está na compra de animais, prática rotineira nas explorações pecuárias, mas, sim, na aquisição de animais sem os devidos cuidados sanitários, principalmente a realização de testes para verificar se o animal adquirido é infectado e para o conhecimento da condição sanitária do rebanho de origem. Concordando com todos esses autores, no presente trabalho, foi verificada maior porcentagem de animais reagentes em

rebanhos cujos proprietários compravam bovinos frequentemente (4,4%) do que em rebanhos cujos proprietários declararam não comprar animais com frequência (1,5%).

Para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, o PNCEBT estabelece o uso em série do AAT como triagem e a RFC ou a combinação do teste de soroaglutinação lenta com o teste do 2-mercaptoetanol (SAL+ME) como teste confirmatório (BRASIL, 2004). Isso significa que apenas animais com resultado positivo no teste de triagem e no teste confirmatório são considerados infectados. No presente estudo, 41 soros apresentaram resultado positivo no teste de triagem, dos quais 26, ou seja, 63,4%, tiveram o resultado positivo confirmado pela reação de fixação de complemento (tabela 15).

Essa porcentagem de confirmação é inferior à observada em outros estudos. MEIRELLES-BARTOLLI e MATHIAS (2009), examinando 2.784 soros bovinos, observaram que 72,3% dos resultados positivos no teste de triagem foram confirmados pela RFC, assim como KURODA et al. (2004) haviam verificado, usando o mesmo teste confirmatório, a confirmação de 83,6% dos resultados positivos na triagem.

Outros estudos que usaram como teste confirmatório SAL+ME também constataram maior proporção de resultados positivos. MEGID et al. (2000) observaram que 93,4% dos soros positivos no AAT tiveram esse resultado confirmado. Usando o mesmo protocolo de testes, KURODA et al. (2004) verificaram a confirmação de 90,4% dos resultados, e GREVE et al. (2007) constataram a positividade em 88% dos soros.

O PNCEBT indica o TAL como ferramenta de vigilância epidemiológica, sendo usado apenas em amostras de leite de grupos de animais (BRASIL, 2004). Neste trabalho, o TAL apontou a presença de brucelose em 10,8% dos rebanhos. Já o AAT indicou que 43,2% dos rebanhos tinham pelo menos um animal positivo, e a série AAT e RFC resultou em 32,4% de rebanhos com pelo menos um animal positivo. ACYPRESTE et al. (2002) observaram que o TAL proporcionou resultado positivo em 11,11% dos rebanhos estudados na bacia leiteira de Goiânia, ao

passo que os resultados do AAT mostraram a presença de pelo menos um animal reagente em 17,78%. Esses dados mostram que, apesar da elevada sensibilidade atribuída ao TAL, os testes sorológicos mostraram maior capacidade de detectar rebanhos infectados, o que está de acordo com as afirmações de GONZÁLEZ TOMÉ e SAMARTINO (1997), segundo os quais o teste do anel do leite não é o procedimento mais adequado para detectar rebanhos infectados.

A concordância observada entre o TAL e o AAT, no presente trabalho, para detectar rebanhos infectados não foi boa, com kappa 0,27 e 67,6% de resultados concordantes; já com o teste confirmatório, a concordância foi maior ($K = 0,40$; 78,4% de resultados concordantes). Melhor concordância do TAL com o teste confirmatório também foi observada por SILVA et al. (2002), que compararam o TAL com a soroaglutinação rápida e com o teste do mercaptoetanol.

SILVA JÚNIOR et al. (2007) observaram boa concordância entre os resultados do TAL realizado no leite de conjunto e a presença de animais positivos no rebanho indicada pela série AAT e SAL+ME. Verificaram uma proporção de resultados concordantes de 92,6%, em comparação com a proporção de 78,4% observada no presente estudo, no caso da série AAT e RFC. Os dados daqueles autores resultam em kappa de 0,83, indicando boa concordância, bastante acima do valor 0,40 observado neste estudo, entre o TAL e a série AAT e RFC.

No presente trabalho, constatou-se a ocorrência de rebanhos nos quais os testes sorológicos individuais acusaram a presença de animais positivos, mas o TAL apresentou resultado negativo. De 16 rebanhos com pelo menos um animal positivo no AAT, 4 (25%) foram positivos no TAL, e de 12 rebanhos com resultado positivo na série AAT e RFC, apenas 4 (33,3%) foram positivos no TAL. Esses resultados são diferentes daqueles obtidos por SILVA JÚNIOR et al. (2007), que observaram resultado positivo no TAL em 16 (84,2%) de 19 amostras formadas por animais positivos na série AAT e SAL+ME. Isso indica que o TAL, no presente estudo, não apresentou a mesma capacidade de detectar rebanhos infectados demonstrada em outros estudos, o que pode estar relacionado com a quantidade de anticorpos secretadas no leite pelos animais reagentes, além da produção de

leite da vaca reagente e consequente diluição no leite de outras vacas não reagentes, além das propriedades do antígeno usado no teste (BRINLEY MORGAN, 1967).

Já a situação contrária não foi observada no presente trabalho, ou seja, não se observou amostra positiva no TAL em rebanhos com todos os animais negativos nos testes individuais, ao passo que SILVA JÚNIOR et al. (2007) encontraram 1 (2,9%) amostra positiva no TAL entre os 35 rebanhos com animais negativos no teste individual pelo AAT e SAL+ME. As observações desta pesquisa também são diferentes daquelas feitas por BONETTI et al. (1994) em Uruguaiana, RS, os quais verificaram reações no TAL que foram consideradas inespecíficas, pois nenhum rebanho com resultado positivo nesse teste apresentava animal reagente no AAT. Esses autores atribuíram essa ocorrência à provável presença de animais com mastite, situação que pode induzir reações positivas falsas no TAL (BRINLEY MORGAN, 1967).

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nas condições em que o trabalho foi realizado permitem as conclusões que seguem abaixo.

A prevalência aparente de brucelose bovina entre os animais estudados foi de 3,2%, e a prevalência verdadeira foi estimada em 2,9%. A prevalência de focos de brucelose foi de 32,4%.

Os fatores analisados que mostraram associação com a frequência de animais reagentes foram número de animais no rebanho, não vacinação com a amostra B19 e compra frequente de animais, indicando a necessidade de dar ênfase à vacinação das bezerras e à adoção de medidas de controle sanitário para a introdução de animais nos rebanhos, de modo a baixar a prevalência da brucelose bovina.

O teste de anel do leite não apresentou boa concordância com os testes individuais realizados no soro sanguíneo para identificar a presença de infecção no rebanho, mostrando-se inferior àqueles para essa finalidade.

8. REFERÊNCIAS

(De acordo com as normas ABNT-NR 6023)

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed. Washington: OPS, 2001. v.1, p.28-56.

ACYPRESTE, C.S. ; SILVA, L.A.F. ; MESQUITA, A.J. ; FIORAVANTI, M.C.S. ; DIAS FILHO, F.C. ; RAMOS, L.S. Diagnóstico da frequência da brucelose bovina em vacas em lactação na bacia leiteira de Goiânia pelas provas do anel do leite e rosa Bengala. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.3, p.59-65. 2002.

ALTON, G.G. ; JONES, L.M. ; ANGUS, R.D. ; VERGER, J.M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut Nacional de la Recherche Agronomique, 1988. 190 p.

BONETTI, A.L. ; CORRÊA, G.L.B. ; BONETTI JUNIOR, A.L. ; ROSA, V. Levantamento de brucelose com a prova do anel do leite (PAL), na plataforma de entrega de leite no Município de Uruguaiana, RS, Brasil. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.1, n.1, p.46-51, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília, 1977. p 525-602.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 2001. Seção 1, p. 11-17.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 6, de 08 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan. 2004. Seção 1, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária- **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Brasília: Departamento de Saúde Animal, 2006a. p. 188. (Manual Técnico)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Universidade de São Paulo. **Situação Epidemiológica da Brucelose Bovina e Bubalina no Brasil**. São Paulo: USP, 2006b. p.83. (Relatório, 1).

BRINLEY MORGAN, W.J. The serological diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Record**, London, v. 80, n.24, p. 612-620, 1967.

CARRILLO, C.G.; LUCERO, N.E. **Enfermedades de los bovinos: brucelosis bovina**. Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sur, 1993. 219 p.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN,L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA,F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de

São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p. 118-125, 2009.

DOHOO,I.; MARTIN, W.; STRYHN,H. **Veterinary epidemiologic research**. Charlottetow: AVC, 2003. p. 706.

GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO, T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p. 35-45, 2009.

GONZÁLEZ TOMÉ, J.; SAMARTINO, L.E. Eficacia de la prueba del anillo en la leche para el control y erradicacion de la brucelosis bovina. **Veterinaria Argentina**, Buenos Aires, v.14, n.137, p. 449-459, 1997.

GREVE, I.C.; ZERBINATI, J.; LEAL, R.F.; AMORIM, L.M.P.V.; SILVA, D..L.; OLIVEIRA, E.M.D.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R.B. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Acadêmica**, Rio de Janeiro, v. 5, n.3, p. 255-263, 2007.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>>. Acesso em: 09 mar. 2010.

KELLAR, J.; MARRA, R.; MARTIN, W. Brucellosis in Ontario: A case control study. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v.40, n.2, p. 119-128, 1976.

KURODA, R.B.S.; PAULIN, L.M.S.; NOZAKI, C.N.; SILVA JUNIOR, F.F.; GERONUTTI, L.; MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da Serra de Botucatu – Estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroaglutinação lenta em tubos, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.137-142, 2004.

LAGE, A.P.; POESTER, F.P.; PAIXÃO, T.A.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K.L.; ALVES, C.M.; MOL, J.P.S.; SANTOS, R.L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p. 202-212, 2008.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v.33, p. 159-174, 1977.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 5, 2000.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Uso da reação de fixação de complemento na confirmação de resultados positivos no teste do antígeno acidificado tamponado para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.25, n.2, p. 68-71, 2009.

MURAKAMI, T.O.; MATHIAS, L.A.; GIRIO, R..J.S.; OLIVEIRA, A.V.; PUPIN, A.R.S.A. Estimativa da prevalência da brucelose bovina nos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, Estado de São Paulo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.19, n.1, p. 63-70, 2003.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, New York, v.24, p.69-98, 1980.

PACHECO, A.M.; FREITAS, E.B.; BÉRGAMO, M.; MARIANO, R.S.; ZAPPA, V. **A importância da brucelose bovina na saúde pública**. In: SIMPOSIO DE CIENCIAS APLICADAS DA FAEF, 11., 2008, Garça. **Anais...**p.39-40

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate a brucelose bovina: situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p.154

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P, Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Chicago, v.90, p. 55-62, 2002.

RIBEIRO, V.F. **Controle e erradicação da brucelose bovina**. Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2000. p. 39.

SALMAN, M.D.; MEYER, M.E. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: Literature review of disease-associated factors. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, n.8, p. 1557-1560, 1984.

SCHWABE, C.W.; RIEMANN, H.P.; FRANTI, C.E. **Epidemiology in veterinary practice**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977. p.303

SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.3-4, 2010, p.392-398.

SILVA, J.A.B.; SILVA, J.B.; BORGES, G.T.; ACYPRESTE, C.S.; SANTANA, A.P.; SILVA, L.A.F.; OLIVEIRA, A.S. Diagnóstico de brucelose bovina utilizando a prova do mercaptoetanol em propriedades positivas ou suspeitas para a prova do anel

do leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais**....CD-ROM.

SILVA JÚNIOR, F.F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.2, p.295-300, 2007.

VAN WAVEREN, G.M. The control of brucellosis in cattle in the Netherlands. **Veterinary Record**, London, v.72, n.44, p.928-933, 1960.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO/CDS/EPR/2006.7, p.89, 2006.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, 2252-2260, 2009 .

