

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS
MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA
ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO. PREVALÊNCIA,
FATORES DE RISCO E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Tiyo Okada Murakami

Médica Veterinária

Jaboticabal - SP - Brasil

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS
MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA
ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO. PREVALÊNCIA,
FATORES DE RISCO E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Tiyo Okada Murakami

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Medicina Veterinária Preventiva, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias *Campus* de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista.

Jaboticabal - SP

Fevereiro - 2003

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TIYO OKADA MURAKAMI – nascida em Jaboticabal, SP, em 20 de maio de 1953. Filha de Sakuji Okada e Fumie Okada. Médica Veterinária, CRMV-SP nº 2129, graduada em 1977 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Jaboticabal. Em 1978 foi bolsista da Secretaria de Estado da Saúde, Instituto Adolfo Lutz em Ribeirão Preto, SP. Em 1978 foi admitida por meio de prova de seleção como Médica Veterinária na Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, onde atualmente exerce o cargo de Pesquisador Científico junto à Agência Paulista do Desenvolvimento Tecnológico (APTA), no Departamento de Descentralização do Desenvolvimento (DDD) do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Leste, situado em Ribeirão Preto, SP, e atendendo à Secretaria da Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo. Em 1995 obteve o grau de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *Campus* Jaboticabal. Em 1999 iniciou o Curso de Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, nessa mesma instituição.

“...É difícil crer na descoberta de um fato científico e divulgá-lo. Estudar durante dias, semanas e até mesmo anos, lutar contra si mesmo, fazer e refutar suas experiências. Mas quando se tem uma certeza, esta é uma das maiores alegrias que podem ser sentidas por uma alma humana. E a idéia de ter contribuído para a honra de seu país, torna esta alegria ainda mais profunda. Pois se a ciência não tem país, o cientista deve ter o seu país.”

Louis Pasteur

(durante a inauguração do INSTITUTO PASTEUR, em 1888)

*Ao meu pai, Sakuji, em memória,
pela presença constante e por ter sido
grande incentivador de minha formação, e
à memória de minha mãe, Fumie.
Com eterna gratidão,
OFEREÇO este trabalho.*

*Ao meu esposo, Mário,
companheiro desta caminhada,
pelo estímulo maior e pelo apoio, e aos meus filhos,
Juliana, Leandro e Mário Augusto
DEDICO*

HOMENAGEM

*À minha família, especialmente irmãos e cunhados,
pelo apoio incansável, tornando assim possível
a realização de meu curso de Doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho foram envolvidas muitas pessoas e entidades, contribuindo para que se pudesse atingir os objetivos. A todos que nos facultaram condições para vencer essa jornada, prestamos agradecimentos, especialmente:

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Mathias, grande mestre e amigo, pela firme orientação, paciência e pelos sábios ensinamentos na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul José Silva Gírio, pelo valioso apoio, pela amizade e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Médico Veterinário Antônio Vítor de Oliveira, Diretor Técnico da Agência de Defesa Agropecuária – Regional Franca, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pela colaboração inestimável e pelo significativo apoio durante as coletas do material examinado neste trabalho.

À Médica Veterinária Ana Rita Scozaffave Alves Pupin da Casa da Agricultura de Altinópolis da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pela extraordinária colaboração e pelo valioso auxílio neste trabalho.

À Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pelo constante apoio profissional, pelo incentivo e estímulo à pesquisa e pelos indescritíveis laços fraternos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da FCAVJ-Unesp, especialmente da Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, pela dedicação e pelos ensinamentos recebidos.

Ao Sr. Luís Valter Ferreira, prefeito (1997-2000) do Município de Altinópolis, pelo eficiente apoio e pela incontestada atenção em melhorar a sanidade animal do município.

Aos funcionários da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Srs. Luiz Antônio Pollo, Antônio Cláudio Matheus, Geraldo Antônio

Guimarães e José Carlos da Silva, pela amizade e pelo primoroso apoio concedido na execução prática deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAVJ-Unesp, pelo auxílio, especialmente ao Nivaldo Aparecido de Assis, pelo valioso apoio técnico.

Às pós-graduandas Ana Paula Massae Nakage Canesin e Luciana Nakaghi Ganeco, pela dedicação e inestimável colaboração na elaboração deste trabalho e pelo inequívoco companheirismo.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pela amizade, pelo agradável convívio e proveitoso intercâmbio cultural.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, ao Instituto Biológico e à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, pela oportunidade de crescimento profissional e científico proporcionada.

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

Tese redigida segundo as normas estabelecidas pelo Regulamento dos Programas de Pós-graduação da FCAV-Unesp de 22-8-2000, conforme disposto no Art. 45 (Parágrafo único), aprovado pela Congregação desta Unidade Universitária em 09/09/2001, tendo a apresentação na forma de capítulos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURA	v
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
Referências	4
CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO	6
RESUMO	6
1. Introdução	7
2. Material e métodos	9
2.1. População estudada	9
2.2. Determinação do tamanho da amostra	10
2.3. Procedimento de amostragem	11
2.4. Colheita de sangue	12
2.5. Técnicas sorológicas usadas na determinação da prevalência	12
2.5.1. Prova de soroaglutinação em placa	13
2.5.1.1. Técnica	13
2.5.1.2. Antígeno	13
2.5.2. Prova do antígeno acidificado tamponado	13
2.5.2.1. Técnica	14

2.5.2.2. Antígeno	14
2.5.3. Reação de fixação de complemento	14
2.5.3.1. Técnica	14
2.5.3.2. Antígeno	14
2.5.3.3. Complemento	15
2.5.3.4. Sistema hemolítico	15
2.6. Estimativa do parâmetro	15
2.7. Análise estatística	15
3. Resultados	16
4. Discussão	20
5. Referências	22
 CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DE FATORES ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO	 25
RESUMO	25
1. Introdução	26
2. Material e métodos	28
2.1. População estudada	28
2.2. Amostra Examinada.....	28
2.3. Técnicas sorológicas	28
2.4. Características dos animais e dos rebanhos examinados	29
2.5. Análise estatística	29
3. Resultados	29
4. Discussão	39
5. Referências	47

CAPÍTULO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE A PROVA DE SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA E A PROVA DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO COMO TESTES DE TRIAGEM NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA	50
RESUMO	50
1. Introdução	50
2. Material e métodos	53
2.1. Soros examinados	53
2.2. Provas sorológicas	53
2.3. Análise estatística	53
3. Resultados	54
4. Discussão	56
5. Referências	58
CAPÍTULO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO E A PROVA DO MERCAPTOETANOL COMO TESTES CONFIRMATÓRIOS NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA	61
RESUMO	61
1. Introdução	62
2. Material e métodos	64
2.1. Soros examinados	64
2.2. Testes sorológicos	64
2.2.1. Reação de fixação de complemento	64
2.2.2. Prova do mercaptoetanol	64
2.3. Análise estatística	65

3. Resultados	65
4. Discussão	67
5. Referências	68
CAPÍTULO 6 - IMPLICAÇÕES	72
Referências	74
ANEXO	76

LISTA DE FIGURA

CAPÍTULO 2

	Página
Figura 1: Localização dos municípios de Altinópolis e Santo Antônio da Alegria, Estado de São Paulo	9

LISTA DE QUADROS

Página

CAPÍTULO 2

Quadro 1 - Bovinos em idade de reprodução e número de propriedades dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	10
Quadro 2 - Amostras de sangue de bovinos obtidas nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, de acordo com o município, o setor e o número de propriedades examinadas. Estado de São Paulo, 2000.	12

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Número (N ^o) e porcentagem (%) de bovinos reagentes na prova do antígeno acidificado tamponado para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	17
Tabela 2 - Número (N ^o) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 100) na prova de soroaglutinação em placa para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	18
Tabela 3 - Número (N ^o) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	18
Tabela 4 - Número (N ^o) e porcentagem (%) de rebanhos bovinos com pelo menos um animal reagente (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	19
Tabela 5 - Número (N ^o) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose, nos rebanhos com pelo menos um animal reagente, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.	20

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo $\geq$ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com a faixa etária dos animais, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	34
Tabela 2- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo $\geq$ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com o sexo dos animais, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	34
Tabela 3- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo $\geq$ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com a finalidade da exploração, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	34
Tabela 4- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento $\geq$ 4) para brucelose, de acordo com a área de propriedade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	34
Tabela 5- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento $\geq$ 4) para brucelose, de acordo com o número de animais do rebanho, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	35

Tabela 6- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a produção diária de leite, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	35
Tabela 7- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a faixa etária do proprietário, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	35
Tabela 8- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o grau de escolaridade do proprietário, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	35
Tabela 9- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de o proprietário ser ou não o responsável pelo manejo, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	36
Tabela 10- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de a propriedade dispor ou não de orientação técnica, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	36

Tabela 11- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de fazer ou não exame de brucelose regularmente, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	36
Tabela 12- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de vacina contra brucelose, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	36
Tabela 13- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de exigir ou não exame negativo de brucelose antes de introduzir animais novos no rebanho, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	37
Tabela 14- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de usar ou não piquete-maternidade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	37
Tabela 15- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de comprar ou não animais em leilão, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	37

Tabela 16- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a fonte de água para os animais da propriedade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	37
Tabela 17- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de inseminação artificial (IA), nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	38
Tabela 18- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de transferência de embrião (TE), nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	38
Tabela 19- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o sistema de criação, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	38
Tabela 20 - Risco relativo (RR), intervalo de confiança do risco relativo (IC), risco atribuível (RA), risco atribuível populacional (RAP), qui-quadrado (X^2) e significância estatística (p) observados conforme as características estudadas em bovinos (n = 1.459) dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	38

Tabela 21 - Risco relativo (RR), intervalo de confiança do risco relativo (IC), risco atribuível (RA), risco atribuível populacional (RAP), qui-quadrado (X^2) e significância estatística (p) observados conforme as características da propriedade, do proprietário ou do rebanho bovino estudado (n = 132) nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	39
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Resultados revelados pela prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e pela prova de soroaglutinação em placa (SAP) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	55
Tabela 2 - Comparação entre os resultados da prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT)) e da prova de soroaglutinação em placa (SAP), adotando-se o título 1/25 como ponto de corte, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	55
Tabela 3 - Comparação entre os resultados da prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e da prova de soroaglutinação em placa (SAP), adotando-se o título 1/50 como ponto de corte, para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	56

CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Títulos obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da prova do mercaptoetanol (ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	66
Tabela 2 - Interpretação dos títulos obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da prova do mercaptoetanol (ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000	67

EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO. PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

RESUMO - Os objetivos deste trabalho foram: estimar a prevalência da brucelose bovina nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, SP; avaliar fatores de risco associados à taxa de prevalência; comparar as provas do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e de soroaglutinação em placa (SAP) como testes de triagem no diagnóstico da brucelose bovina; e comparar as provas de fixação de complemento (FC) e 2-mercaptoetanol (ME) como testes confirmatórios. Foi obtida, aleatoriamente, uma amostra de 1.459 soros sanguíneos de bovinos de 132 rebanhos, que foram examinados pela PAAT e pela SAP. Os soros com reação nesses testes foram examinados também pelas provas de FC e ME. Foram também obtidas, por meio de um questionário, informações sobre características dos animais e dos rebanhos estudados. Constatou-se que 3,43% dos animais foram reagentes pela FC, e 16,67% dos rebanhos tinham pelo menos um animal reagente. Os fatores mais associados à prevalência foram sexo e idade dos animais e a introdução de animais no rebanho sem a exigência de exame de brucelose negativo. A PAAT apresentou melhor desempenho que a SAP como teste de triagem, e a FC apresentou melhor desempenho que a ME como teste confirmatório.

Palavras-Chave: Antígeno acidificado tamponado, fixação de complemento, mercaptoetanol, soroaglutinação em placa

**EPIDEMIOLOGY OF BOVINE BRUCELLOSIS IN ALTINÓPOLIS AND SANTO
ANTONIO DA ALEGRIA, STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL. PREVALENCE, RISK
FACTORS AND DIAGNOSIS METHODS**

ABSTRACT - The purposes of this investigation were: to estimate de prevalence of bovine brucellosis in Altinópolis and Santo Antonio da Alegria, State of São Paulo, Brazil; to evaluate risk factors associated to the prevalence rate; to compare the rose Bengal and the plate agglutination serum tests for screening; and to compare the complement fixation and the mercaptoetanol as confirmatory tests. A sample of 1,459 sera from 132 herds were obtained at random and tested by the rose Bengal and the plate agglutination tests. Sera reacting at any of these tests were also tested by the complement fixation and by de mercaptoethanol test. Informations about the animais and the herds studied were also obtained. The results showed that 3.43% of the animals reacted to the complement fixation test, and 16.67% of the herds had at least one reacting animal. The factors more associated to the prevalence rate were sex and age of the animals and the introduction of animals in the herd without a negative test for brucellosis. The rose Bengal plate test peformed better than the plate agglutination test for screening, and the complement fixation test performed better than the mercaptoethanol test for the confirmatory diagnosis.

Keywords: Complement fixation test, mercaptoethanol test, plate agglutination test, rose Bengal test

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A brucelose bovina foi caracterizada no final do século XIX pelo veterinário dinamarquês Bernhardt Laurits Bang, o qual identificou, em 1896, o agente etiológico e conseguiu a reprodução experimental da enfermidade então conhecida como aborto epizootico bovino (SCHREIBER & MATHYS, 1987).

Ao longo do século XX, foi constatada em todos os continentes e praticamente em todos os países, causando sérios prejuízos à atividade pecuária e também constituindo um risco para o ser humano, por se tratar de uma zoonose que atinge especialmente determinados grupos ocupacionais.

O agente etiológico pertence ao gênero *Brucella*, nome dado em homenagem ao médico David Bruce, o primeiro pesquisador a identificar, em 1886, uma bactéria das que atualmente formam o gênero.

Sete biovars compõem a espécie *Brucella abortus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY, 1988), agente da brucelose bovina, e o biovar 1 é o mais difundido, ocorrendo praticamente no mundo todo (ACHA & SZYFRES, 2001).

Embora o hospedeiro preferencial seja o bovino, a *B. abortus* pode infectar também outras espécies, como búfalos, camelos, cervídeos, cães, eqüinos, ovinos e o homem (STACK & MACMILLAN, 1999).

A brucelose bovina ocorre no mundo todo, mas alguns países obtiveram êxito em erradicá-la, como Alemanha, Áustria, Bélgica, Bulgária, países componentes da antiga Tchecoslováquia, Dinamarca, Finlândia, Hungria, Noruega, Holanda, Romênia, Suécia e Suíça. A maioria dos países europeus já está livre da enfermidade, assim como a grande maioria dos estados americanos. 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, os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento mostram que a doença ocorre em todo o país, embora com taxas variáveis (BRASIL, 1996).

A importância da brucelose bovina está relacionada com as perdas econômicas provocadas pela enfermidade, causadas por abortamento, queda de fertilidade, necessidade de descarte de animais infectados, nascimento de bezerros fracos etc., e também com os custos de tratamento das pessoas doentes, por se tratar de uma zoonose, além das perdas por horas não trabalhadas e baixa produtividade no trabalho.

Estimativas sobre os custos representados pela brucelose mostram prejuízos de grande monta. Na América Latina, há estimativas segundo as quais o prejuízo causado pela brucelose bovina situa-se ao redor de U\$ 600 milhões por ano (ACHA & SZYFRES, 2001).

FORNIELES & SCENA (1999) estimaram o efeito do descarte de matrizes positivas para brucelose sobre a dinâmica populacional e o lucro em rebanhos de corte e concluíram que os descartes resultam em uma diminuição da margem bruta de lucro de 23,2%, 34,4%, 44,9% e 54,7% admitindo-se o descarte de 5%, 10%, 15% e 20%, respectivamente, das matrizes.

As vacas constituem a categoria mais susceptível à brucelose bovina, principalmente aquelas em gestação, embora os touros também seja susceptíveis.

Quando a infecção é introduzida em um rebanho livre, difunde-se rapidamente, provocando grandes perdas, principalmente por abortamentos. Calcula-se que a maioria das vacas infectadas aborte apenas uma vez em decorrência da brucelose.

O agente etiológico da brucelose bovina é eliminado para o meio exterior principalmente por intermédio do feto, dos anexos e dos líquidos fetais, que contêm grande quantidade da bactéria. Esse material vai contaminar a pastagem, que, ao ser ingerida pelo animal, constitui o principal meio de transmissão da enfermidade.

O fato de a enfermidade atingir principalmente o aparelho reprodutor leva à idéia de que a doença seja transmitida por via venérea. No entanto, há bastante tempo foram desenvolvidos experimentos demonstrando que a monta natural não desempenha papel importante na cadeia epidemiológica da brucelose bovina, como demonstrou THOMSEN (1943).

A história do combate à brucelose bovina no mundo todo ao longo do século XX mostra que os programas bem sucedidos basearam-se no esquema teste e abate, ou

seja, identificação dos animais infectados e descarte desses animais. Daí a importância de métodos de diagnóstico práticos e confiáveis, que permitam o exame de grande número de amostras e proporcionem resultados com a menor proporção possível de erros.

Diversos recursos podem ser empregados no diagnóstico da brucelose, mas, pela praticidade e pelo baixo custo, os testes sorológicos constituem a ferramenta mais utilizada nos programas de controle.

Muitas foram as técnicas sorológicas já avaliadas para uso no diagnóstico dessa enfermidade, e entre elas merecem destaque o teste rosa de Bengala como prova de triagem e a reação de fixação de complemento como prova confirmatória, pois foi esse o esquema utilizado pela maioria dos países que conseguiram erradicar a brucelose, ou pelo menos diminuir drasticamente as taxas de prevalência.

No Brasil, a prova mais utilizada sempre foi a soroaglutinação rápida em placa, mas com a instituição do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, em janeiro de 2001, essa prova está deixando de ser utilizada (BRASIL, 2001). Esse programa prevê também o uso da prova do antígeno acidificado tamponado, ou rosa de Bengala como prova de triagem e da prova do mercaptoetanol como teste confirmatório.

Outro recurso de combate à brucelose bovina, principalmente nas áreas com taxa de prevalência relativamente elevada, é a vacinação. Para esse propósito, a vacina mais utilizada foi aquela preparada com a amostra B 19, cepa isolada na década de 20 do século passado por John Buck, veterinário americano.

Essa amostra foi amplamente utilizada em todo o mundo, mas, apesar dos relevantes benefícios, apresenta o inconveniente de induzir o surgimento de títulos de anticorpos que podem proporcionar reações positivas nos testes de diagnóstico.

Esse inconveniente motivou a geração de um número muito grande de investigações, com diversos enfoques, um deles voltado para o propósito de desenvolver vacinas que não induzem títulos sorológicos. Como resultado desse tipo de pesquisa, SCHURIG et al. (1991) obtiveram uma variante rugosa de *B. abortus*, denominada RB 51, que vem sendo usada, em alguns países, em substituição à vacina

B 19. Por ser uma amostra rugosa, os anticorpos eventualmente formados não reagem com os antígenos de variantes lisas usados nos testes de diagnóstico. Isso representa uma vantagem inquestionável, pois, não havendo essa restrição, podem ser vacinados mesmo animais adultos. O uso dessa vacina ainda não foi autorizado no Brasil, mas a nova legislação deixa uma abertura para o emprego de "... imunógenos que não interferem nos testes de diagnóstico, após aprovação e nas condições definidas pelo Departamento de Defesa Animal." (BRASIL, 2001).

Apesar de muito tempo já ter transcorrido desde a descoberta da brucelose bovina, apesar da convicção sobre sua inegável importância, e apesar de o conhecimento científico acumulado permitir seu controle, a enfermidade continua a ocorrer na maior parte dos países, particularmente naqueles que não investiram o suficiente em pesquisa e em programas de controle. Dessa forma, se faz necessário o empreendimento de esforços, por parte de todos os países onde a doença ocorre, para conhecer a real situação da brucelose, por meio de trabalhos de pesquisa e de vigilância sanitária, para que se possa almejar o controle de tão importante enfermidade.

Imbuído desse propósito, o presente trabalho teve por objetivo contribuir para um melhor conhecimento sobre a situação da brucelose bovina em uma área do Estado de São Paulo e avaliar técnicas sorológicas de diagnóstico cujo uso está previsto na nova legislação brasileira.

Referências

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. v. 1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.

BRASIL Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brucelose bovina. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v. 29, n. 1-4, p. 41-47, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 2001. Seção 1, p. 11-17.

FORNIELES, A.S.R.; SCENA, C. Efecto del descarte de vientres positivos a brucelosis sobre la dinámica poblacional y el margen bruto del rodeo de cría. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 78, n. 5, p. 362-364, 1999.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 450-452, 1988.

SCHREIBER, W.; MATHYS, F.K. Brucelosis. In: _____. **Historia de las enfermedades infecciosas**. Basilea: La Roche & Cia, 1987. p. 155-157.

SCHURIG, G.G.; ROOP, R.M.; BAGCHI, T.; BOYLE, S.; BUHRMAN, D.; SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB 51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 171-188, 1991.

STACK, J.A.; MACMILLAN, A.P. Identification and biotyping of *Brucella* spp. BruNet Publications. Disponível em: <http://progress.box.co.il/brunet/>. Acesso em: 22 jul. 1999.

THOMSEN, A. Does the bull spread infectious abortion in cattle? Experimental studies from 1936 to 1942. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 53, n. 3, p. 199-211, 1943.

CAPÍTULO 2 - ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - Devido à escassez de informações que mostrem a situação epidemiológica da brucelose no Brasil, o presente trabalho teve por objetivo estimar a prevalência da enfermidade na população bovina dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo. Para isso, foi obtida aleatoriamente uma amostra de 1.459 animais, de 132 rebanhos, cujos soros sangüíneos foram examinados pela prova de soroaglutinação em placa e pelo teste rosa Bengala; aqueles com reação em uma dessas provas foram também submetidos à reação de fixação de complemento. Na prova de soroaglutinação em placa, foram positivos 2,12% dos animais examinados, 3,15% foram positivos no teste rosa Bengala, e 3,43% (intervalo de confiança entre 2,49% e 4,37%, com 95% de probabilidade) foram positivos na reação de fixação de complemento. As taxas de positivos à reação de fixação de complemento nos dois municípios não diferiram significativamente ($p > 0,05$), mas houve diferença significativa entre as taxas de animais positivos nos diversos setores que compõem os dois municípios. Dos 132 rebanhos que tiveram amostras examinadas, 16,67% tinham pelo menos um animal positivo na reação de fixação de complemento (intervalo de confiança de 10,32% a 23,02%, com 95% de probabilidade). Enquanto nas amostras de 110 dos rebanhos não se observou nenhum animal reagente, houve amostra com até 50,00% de animais reagentes, mostrando a desigualdade de situação entre os rebanhos que compõem a área estudada.

Palavras-Chave: Antígeno acidificado tamponado, fixação de complemento, soroaglutinação em placa

1- Introdução

Embora a brucelose seja, indiscutivelmente, um dos principais problemas sanitários do rebanho bovino brasileiro, há pouca informação segura sobre a taxa de prevalência da enfermidade ao longo do território nacional.

A dificuldade no conhecimento dessa taxa está associada a diversos fatores, entre os quais podem ser citados: a grande extensão territorial, o grande número de animais que compõem o rebanho brasileiro, a escassez de recursos financeiros e o grande esforço necessário para manter atualizado esse tipo de informação.

Não havendo a produção de dados que fomentem de forma sistemática as estatísticas de ocorrência de brucelose, não há informações seguras que possam orientar os programas de controle.

Acrescente-se que a própria disponibilidade de diversas técnicas de diagnóstico, como ocorre no caso da brucelose, muitas vezes tira a comparabilidade entre os dados eventualmente obtidos por diversas fontes.

Os poucos dados mais recentes disponíveis abrangendo todo o país são aqueles divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Esses dados, entretanto, não são produzidos de modo a retratar o que ocorre com toda a população, mas, sim, consistem na compilação de resultados de exames realizados pelos médicos veterinários que, ao adquirirem os antígenos para a realização do teste, informam os resultados obtidos em exames anteriores. Esse procedimento, obviamente, apresenta um problema do ponto de vista estatístico, além de que a falta de treinamento e a falta de padronização de procedimentos entre os inúmeros veterinários que realizam o exame ajudam a comprometer a qualidade dos dados obtidos. Somem-se a isso os problemas representados pelo uso da prova de soroaglutinação em placa, na qual se baseiam esses dados.

Segundo as informações do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1996), no período de 1986 a 1996 a proporção de bovinos positivos tem sofrido poucas alterações, variando de 2,34%, no ano de 1989, a 2,91%, em 1987. No

ano de 1996, 2,75% dos bovinos examinados foram positivos pelo teste de soroaglutinação em placa.

Nesse mesmo ano de 1996, os dados mostram que a maior taxa de prevalência encontra-se na região Norte, com 9,53% de animais positivos, enquanto o coeficiente mais baixo, 0,76%, foi constatado na região Sul. Na região Sudeste a taxa foi 1,02%, e entre os estados dessa região a taxa mais baixa foi observada em Minas Gerais (0,53%), e a mais alta, no Rio de Janeiro (2,15%). No Estado de São Paulo, a proporção de animais positivos foi 1,55%.

Entre os poucos dados sobre a ocorrência de brucelose bovina obtidos com o necessário planejamento, pode ser citado um inquérito sorológico nacional realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975. De 71.749 animais examinados, 4,79% apresentaram aglutinação a partir da diluição 1/100 na prova de soroaglutinação em placa. Na região Sudeste, 6,73% de 27.544 animais foram reagentes, e no Estado de São Paulo, 8,25% de 6.145 bovinos examinados. No Estado de São Paulo, 22,7% de 1.550 rebanhos tinham animais reagentes (ANSELMO & PAVEZ, 1977).

Como etapa preparatória para a implementação de um programa de combate à brucelose bovina, foi realizado, no Estado de Minas Gerais, em 1980, um estudo envolvendo 25.010 animais, dos quais 6,57% foram reagentes, e 4.096 propriedades, 20,46% das quais tinham pelo menos um animal positivo na prova de soroaglutinação em placa (CASTRO, 1997).

Entre os dados mais recentes pode ser mencionado o trabalho de RIBEIRO et al. (1996), que examinaram 996 amostras de bovinos, obtidas aleatoriamente, de 68 rebanhos do Município de Indianópolis, MG, e observaram uma taxa de 1,7% de animais positivos na prova de soroaglutinação em placa, e uma proporção de 17,64% de rebanhos com animais positivos.

Mais recentemente, um levantamento feito no Estado de São Paulo, envolvendo 8.904 vacas, mostrou uma prevalência de 1,11% (POMPEI et al., 2002)

Os dados relativos à situação da brucelose bovina na região onde foi feito o trabalho são igualmente escassos. Em um estudo realizado com bovinos leiteiros do Município de Pitangueiras, SP, nos anos de 1990, 1991, 1992 e 1993, SAMARA et al.

(1996) encontraram, usando as provas de soroaglutinação em placa e em tubo, taxas de 6,2%, 13,8%, 18,7% e 16,8%, respectivamente, de animais reagentes.

Considerando a escassez de informações obtidas de modo a proporcionar um conhecimento sobre a situação da brucelose bovina e a importância da obtenção de dados atualizados que mostrem a real situação epidemiológica da enfermidade, de modo a orientar os necessários programas profiláticos, o presente trabalho teve por objetivo estimar a prevalência da brucelose na população bovina dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo.

2- Material e Métodos

2.1- População estudada

Os municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria formam uma área contígua localizada na região Nordeste do Estado de São Paulo, na fronteira com o Estado de Minas Gerais. Altinópolis localiza-se a $21^{\circ} 01'$ de latitude sul e $47^{\circ} 22'$ de longitude oeste, com uma altitude de 950 m, e Santo Antonio da Alegria localiza-se a $21^{\circ} 05'$ da latitude sul e $47^{\circ} 09'$ de longitude oeste (Figura 1), com uma altitude de 791 m.



Figura 1. Localização dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo.

O Município de Altinópolis possui um rebanho bovino de 23.787 animais, distribuídos em 267 propriedades, e o Município de Santo Antonio da Alegria, 17.387 animais, predominando as raças cruzadas, em 327 propriedades, segundo dados apurados pela Casa da Agricultura, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, no final de 1999.

A população-alvo do presente estudo, constituída pelos bovinos em idade de reprodução, dividida em setores geográficos de acordo com critérios estabelecidos pela Casa da Agricultura local, distribuída conforme mostra o Quadro 1.

Quadro 1- Bovinos em idade de reprodução e número de propriedades dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº de propriedades	Nº de animais
Altinópolis	1	76	2.499
	2	48	3.996
	3	63	2.002
	4	51	2.611
	Subtotal	238	11.108
S. A. Alegria	1	60	1.440
	2	107	1.843
	3	114	3.675
	4	14	265
	Subtotal	298	7.223
Total	-----	536	18.331

2.2- Determinação do tamanho da amostra

Para a determinação do tamanho da amostra empregou-se a seguinte fórmula (ASTUDILLO, 1979):

$$n = \frac{n'}{1 + (n'/N)}$$

$$n' = \frac{z^2 \cdot p \cdot q}{\left(\frac{p \cdot d}{100} \right)^2}$$

Nessa fórmula,

n = Tamanho da amostra a ser examinada

n' = Tamanho da amostra sem levar em conta o tamanho da população

z = Nível de confiança

p = Prevalência esperada

$q = 100 - p$

d = Variação admitida

N = Tamanho da população

Para a determinação do número de animais a serem examinados admitiu-se uma prevalência esperada de 6%, um nível de confiança de 95% (o que equivale a um valor de "z" igual a 1,96) e uma variação de 20%. A aplicação da fórmula citada apontou para a necessidade de examinar um total de 1.390 animais, obtido da seguinte maneira:

$$n' = \frac{1,96^2 \cdot 6 \cdot 94}{6 \cdot 20 \left(\frac{20}{100} \right)^2} = \frac{2.166,66}{1,44} = 1.504,625$$

$$n = \frac{1.504,625}{1 + (1.504,625/18.331)} = \frac{1.504,625}{1,0820809} = 1.390$$

2.3- Procedimento de amostragem

Para a escolha dos animais a serem examinados, foram sorteadas as propriedades, porém somente foi possível examinar animais dos rebanhos cujos proprietários aderiram voluntariamente ao estudo.

Foi obtido um total de 1.459 amostras, distribuídas conforme o Quadro 2:

Quadro 2- Amostras de sangue de bovinos obtidas nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, de acordo com o município, o setor e o número de propriedades examinadas. Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº de propriedades examinadas	Nº de animais examinados
Altinópolis	1	18	170
	2	12	119
	3	16	143
	4	20	208
	Subtotal	66	640
S. A. Alegria	1	14	265
	2	30	352
	3	22	202
	4	0	0
	Subtotal	66	819
Total	---	132	1.459

2.4- Colheita de sangue

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular, usando agulhas descartáveis 40 x 16. Após a retração do coágulo, o soro foi centrifugado, separado e armazenado a - 20°C até o momento do uso.

2.5- Técnicas sorológicas usadas na determinação da prevalência

As provas sorológicas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Unesp de Jaboticabal.

Inicialmente todas as amostras foram submetidas à prova do antígeno acidificado tamponado e à prova de soroaglutinação rápida em placa.

Todo soro positivo na prova do antígeno acidificado tamponado ou que apresentou algum título na prova de soroaglutinação foi submetido à reação de fixação de complemento, a qual foi usada como teste confirmatório para determinar a condição do animal examinado. Foi considerado infectado o animal que apresentou título maior ou igual a 4 nessa prova, conforme recomendam ALTON et al. (1988).

2.5.1- Prova de soroaglutinação em placa

A prova de soroaglutinação em placa foi realizada de acordo com a técnica usualmente utilizada no diagnóstico sorológico da brucelose animal, de acordo com o procedimento preconizado pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1968).

2.5.1.1- Técnica

Esse teste consiste em colocar os volumes de 0,08, 0,04, 0,02, 0,01 e 0,005 mL do soro a ser examinado, volumes que correspondem respectivamente às diluições 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400, em contato com 0,03 mL do antígeno, em uma placa de vidro, deixar reagir por oito minutos e fazer a leitura, observando a formação dos grumos de aglutinação. O título corresponde ao inverso da última diluição na qual se observa aglutinação.

2.5.1.2- Antígeno

Utilizou-se antígeno produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), que consiste em uma suspensão de *Brucella abortus* amostra 1119/3, inativada pelo calor, na concentração de 11% de volume celular, corada por violeta genciana e verde brilhante.

2.5.2- Prova do antígeno acidificado tamponado

Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e "card test", foi realizado segundo a técnica recomendada por ALTON et al. (1988).

2.5.2.1- Técnica

O método consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03 mL do antígeno, em uma placa de vidro, homogeneizar e manter a placa em movimentos rotatórios constantes até o momento da leitura, que é feita após quatro minutos de reação, observando-se a ocorrência dos grumos de aglutinação.

2.5.2.2- Antígeno

Empregou-se antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração de 8% de volume celular, pH 3,63 e corado pelo rosa de Bengala.

2.5.3- Reação de fixação de complemento

Esse teste foi usado para a confirmação do diagnóstico de brucelose.

2.5.3.1- Técnica

Foi empregada microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988).

2.5.3.2- Antígeno

Foi usado o antígeno produzido pelo Tecpar, com *B. abortus* amostra 1119/3, para a prova de soroaglutinação em tubos. Na reação de fixação de complemento o antígeno foi usado em sua dose de reatividade ótima.

2.5.3.3- Complemento

Como complemento utilizou-se soro de cobaio, titulado conforme a técnica descrita por ALTON et al. (1988).

2.5.3.4- Sistema hemolítico

Empregou-se sistema hemolítico formado por hemácia de ovinos sensibilizada com hemolisina (anticorpos de coelho contra hemácia ovina) titulada conforme a recomendação de ALTON et al. (1988).

2.6- Estimativa do parâmetro

A estimativa do parâmetro (taxa de prevalência na população) foi realizada por intervalo de confiança (ASTUDILLO, 1979). Para tanto, foi empregada a seguinte fórmula: $p \pm z \cdot \sqrt{p \cdot q/n}$

Nessa fórmula,

p = prevalência na amostra examinada

q = 100 - p

z = nível de confiança

n = tamanho da amostra examinada

2.7- Análise estatística

A comparação entre as taxas de prevalência observadas nos dois municípios e nos diversos setores de cada município foi efetuada com base no teste de qui-quadrado (BERQUÓ et al., 1980).

3- Resultados

Os resultados da prova do antígeno acidificado tamponado mostram que 3,15% dos 1.459 bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, examinados no presente trabalho apresentaram resultado positivo para brucelose (Tabela 1). No primeiro município a proporção de reagentes foi 4,38% e no segundo foi 2,20%.

Pela Tabela 2 pode-se observar que 2,12% dos animais examinados apresentaram título igual ou superior a 100 na prova de soroaglutinação em placa. Na amostra do município de Altinópolis a proporção de reagentes foi 2,81%, e no município de Santo Antonio da Alegria, 1,59%.

A taxa de prevalência de brucelose bovina na amostra examinada foi 3,43%, de acordo com os resultados da reação de fixação de complemento (Tabela 3). No Município de Altinópolis a taxa foi 4,84%, enquanto no Município de Santo Antonio da Alegria a taxa foi 2,32%. A diferença entre essas taxas foi significativa, conforme os resultados do teste de qui-quadrado ($p < 0,05$).

A comparação entre as taxas observadas nos quatro setores do Município de Altinópolis também resulta em diferença significativa, pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,01$). Essas taxas variaram de 0,84%, no setor 1, a 11,54%, no setor 4 (Tabela 3).

Nos três setores do Município de Santo Antonio da Alegria as taxas variaram entre 0,38%, no setor 1, e 4,26%, no setor 2 (Tabela 3). As diferenças entre essas taxas também foram significativas ($p < 0,01$).

Com base nos critérios adotados para a análise efetuada no presente trabalho, pode-se afirmar que a taxa de prevalência, com 95% de probabilidade, situa-se entre 2,47% e 4,37% de animais reagentes.

Em 22 (16,67%) das 132 propriedades estudadas foi encontrado pelo menos um bovino com título igual ou superior a 4 na reação de fixação de complemento (Tabela 4). No Município de Altinópolis, 10 (15,15%) das 66 propriedades apresentaram

animais reagentes, e no Município de Santo Antonio da Alegria a proporção de rebanhos com problema de brucelose foi 18,18%, uma vez que 12 das 66 propriedades tinham pelo menos um animal reagente (Tabela 4).

A diferença entre as taxas de rebanhos com animais reagentes nos dois municípios não foi significativa, segundo os resultados do teste de qui-quadrado ($p > 0,05$).

Conforme se pode observar pelos dados da Tabela 4, no Município de Altinópolis, a taxa de rebanhos com brucelose variou de 8,33%, no setor 2, a 25,00%, no setor 4, mas essas taxas não diferiram significativamente ($p > 0,05$). No Município de Santo Antonio da Alegria, a proporção de rebanhos com animais reagentes situou-se entre 7,14%, no setor 1, e 26,67%, no setor 2, mas essa diferença também não foi significativa ($p > 0,05$).

Pode-se afirmar, com 95% de confiança, que a proporção de rebanhos com animais reagentes situa-se entre 10,32% e 23,02%.

Nos 22 rebanhos com animais reagentes, a proporção de bovinos com título na reação de fixação de complemento variou bastante, de 4,17% (um animal reagente em uma amostra de 24 animais) a 50,00%, taxa observada na amostra de dois rebanhos, um deles com 15 animais reagentes em 30 examinados (Tabela 5). A diferença entre as proporções de reagentes nessas duas propriedades mencionadas foi significativa pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,01$).

Tabela 1 - Número (Nº) e porcentagem (%) de bovinos reagentes na prova do antígeno acidificado tamponado para diagnóstico de brucelose nos Municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº	%	Total
Altinópolis	1	3	1,76	170
	2	0	0,00	119
	3	3	2,10	143
	4	22	10,58	208
	Subtotal	28	4,38	640
Santo Antonio da Alegria	1	1	0,38	265
	2	14	3,98	352
	3	3	1,49	202
	Subtotal	18	2,20	819
Total	---	46	3,15	1.459

Tabela 2 - Número (Nº) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 100) na prova de soroaglutinação em placa para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº	%	Total
Altinópolis	1	4	2,35	170
	2	0	0,00	119
	3	3	2,10	143
	4	11	5,29	208
	Subtotal	18	2,81	640
Santo Antonio da Alegria	1	1	0,38	265
	2	11	3,13	352
	3	1	0,50	202
	Subtotal	13	1,59	819
Total	---	31	2,12	1459

Tabela 3 - Número (Nº) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº	%	Total
Altinópolis	1	3	1,76	170
	2	1	0,84	119
	3	3	2,10	143
	4	24	11,54	208
	Subtotal	31	4,84	640
Santo Antonio da Alegria	1	1	0,38	265
	2	15	4,26	352
	3	3	1,49	202
	Subtotal	19	2,32	819
Total	---	50	3,43	1459

Estimativa do parâmetro (P) por intervalo de confiança:

$$p \pm z \cdot \sqrt{p \cdot q / n}$$

$$\sqrt{3,43 \cdot 96,57 / 1459} = 0,48$$

$$3,43 - 1,96 \cdot 0,48 = 2,49$$

$$3,43 + 1,96 \cdot 0,48 = 4,37$$

{2,49% - P - 4,37%}

Tabela 4 - Número (Nº) e porcentagem (%) de rebanhos bovinos com pelo menos um animal reagente (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Município	Setor	Nº	%	Total
Altinópolis	1	2	11,11	18
	2	1	8,33	12
	3	2	15,50	16
	4	5	25,00	20
	Subtotal	10	15,15	66
Santo Antonio da Alegria	1	1	7,14	14
	2	8	26,67	30
	3	3	13,64	22
	Subtotal	12	18,18	66
Total	---	22	16,67	132

Estimativa do parâmetro (P) por intervalo de confiança:

$$p \pm z \cdot \sqrt{p \cdot q / n}$$

$$\sqrt{16,67 \cdot 83,33 / 132} = 3,24$$

$$16,67 - 1,96 \cdot 3,24 = 10,32$$

$$16,67 + 1,96 \cdot 3,24 = 23,02$$

{10,32% - P - 23,02%}

Tabela 5 - Número (Nº) e porcentagem (%) de bovinos reagentes (título ≥ 4) na reação de fixação de complemento para diagnóstico de brucelose, nos rebanhos com pelo menos um animal reagente, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Rebanho	Nº de animais examinados	Animais reagentes	
		Nº	%
1	17	2	11,76
2	16	4	25,00
3	30	15	50,00
4	7	2	28,57
5	16	2	12,50
6	12	2	16,67
7	24	1	4,17
8	3	1	33,33
9	15	1	6,67
10	2	1	50,00
11	12	1	8,33
12	13	1	7,69
13	21	1	4,76
14	9	3	33,33
15	18	3	16,67
16	9	2	22,22
17	5	1	20,00
18	8	1	12,50
19	16	1	6,25
20	11	3	27,27
21	11	1	9,09
22	15	1	6,67

4- Discussão

Os dados do presente trabalho expressam uma taxa de 2,12% de animais positivos na prova de soroaglutinação em placa (Tabela 2). Essa porcentagem é ligeiramente maior do que aquela apontada pelos dados do Ministério da Agricultura para o Estado de São Paulo em 1996, 1,55%, e também superior à observada por RIBEIRO et al. (1996) em Indianópolis, MG, 1,7%. Caso fosse adotada a prova do antígeno acidificado tamponado, a proporção de positivos seria 3,15% (Tabela 1). Já pela reação de fixação de complemento, a prevalência foi 3,43%, com intervalo de confiança entre 2,49% e 4,37%, com 95% de probabilidade, como mostra a Tabela 3. Essa prevalência é superior àquela relatada por POMPEI et al. (2002) para o Estado de São Paulo.

No entanto, o coeficiente de prevalência observado na área formada pelos dois municípios é inferior ao observado no levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975, 8,25% de animais positivos no Estado de São Paulo (ANSELMO & PAVEZ, 1977), e no levantamento realizado em Minas Gerais em 1980, que apontou uma prevalência de 6,57% de bovinos reagentes. É também inferior aos valores observados por SAMARA et al. (1996) no Município de Pitangueiras, SP. Essas diferenças poderiam ser atribuídas ao fato de nesses trabalhos ter sido usada a prova de soroaglutinação, que possui menor especificidade, enquanto no presente trabalho foi empregada a reação de fixação de complemento, que possui maior especificidade. É admissível também que, com o decorrer do tempo e com a adoção de medidas profiláticas, pelo menos por uma parte dos proprietários, venha ocorrendo redução na taxa de prevalência, uma vez que houve algum lapso de tempo entre a realização daqueles e a realização deste trabalho.

Os dados do presente trabalho confirmam a idéia de que a situação da brucelose bovina é bastante desigual entre diversas áreas, como mostram os dados do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996), e mesmo entre os diversos rebanhos. Isso pode ser confirmado pela diferença significativa observada entre as taxas de prevalência nos setores que compõem os dois municípios e pode ser visto de forma bastante clara pela diferença de situação entre os 132 rebanhos examinados no presente estudo. Enquanto na amostra de 110 (83,33%) desses rebanhos não se encontrou nenhum animal reagente, houve uma propriedade cuja amostra tinha 15 animais reagentes em 30 examinados (Tabela 5).

A prevalência de propriedades com pelo menos um animal reagente na reação de fixação de complemento foi 16,67%, com intervalo de confiança de 10,32% a 23,02% (Tabela 4), dado parecido com o obtido por RIBEIRO et al. (1996), que encontraram 17,64% de rebanhos com animais positivos na prova de soroaglutinação em placa, em Indianópolis, MG, e ligeiramente inferior àquele observado no Estado de São Paulo pelo Ministério da Agricultura, 22,7% (ANSELMO & PAVEZ, 1977) e àquele encontrado no Estado de Minas Gerais, 20,46% (CASTRO, 1997).

Pelos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que, embora a prevalência de animais reagentes para brucelose não seja tão alta, a proporção de rebanhos com animais infectados é mais elevada, porém em um patamar compatível com a implantação de um programa de controle que possa levar, de forma gradual porém segura, a uma redução nas taxas de prevalência, com boas perspectivas de erradicação da enfermidade na área abrangida pelo estudo.

Considerando a taxa de prevalência de 3,43% observada neste trabalho e uma população de 18.331 animais em idade de reprodução existentes na área estudada, um programa de erradicação exigiria o descarte de 629 animais. Em se tratando de animais cruzados, esse descarte não implicaria um custo muito elevado, o que já ocorreria no caso de animais de alto valor genético. Deve-se também levar em conta que, pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), o proprietário arca com a totalidade do custo de descarte dos animais com brucelose, o que, diante da diversidade de situação entre os rebanhos, significa um custo relativamente baixo para alguns proprietários, mas um custo elevado para aqueles cujo rebanho tenha uma prevalência alta, especialmente quando se trata de pequeno proprietário, de baixo poder aquisitivo, situação que exigiria a indenização para que um programa de erradicação da brucelose bovina tivesse maior chance de êxito.

5- Referências

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

ANSELMO, F.P.; PAVEZ, M.M. Brucelose bovina. In: _____ **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília; Ministério da Agricultura, 1977. p. 525-561.

ASTUDILLO, V.M. **Encuestas por muestreo para estudios epidemiologicos en poblaciones animales**. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1979. 60 p. (Serie de Manuales Didacticos, 12)

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1980. 325 p.

BRASIL Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brucelose bovina. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**. v. 29, n. 1-4, p. 41-47, 1996.

CASTRO, D. Implantação de um sistema de controle da brucelose. 2º ENCONTRO DE ATUALIZAÇÃO TÉCNICA EM PECUÁRIA LEITEIRA DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias *Campus* de Jaboticabal, Unesp, 18/09/1997.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina**. Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. 9 p. (Nota Técnica n. 2, rev. 1)

POMPEI, J.C.A.; CAMPANHA, R.C.; GOTTARDO, D.J.; ISHIZUKA, M.M. Levantamento soroepidemiológico da brucelose bovina em SP. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002. CD-ROM.

RIBEIRO, S.C.A.; OLIVEIRA, P.R.; CAMILO, V.; SILVEIRA, M.C.A.C. Prevalência de brucelose e leptospirose bovinas como etiologias de aborto no Município de Indianópolis-MG. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 25, 1996, Campo Grande. **Resumos ...** Campo Grande: CBC, 1996. p. 278.

SAMARA, S.I.; SEIXAS, L.F.Z.; OLIVEIRA, M.A. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueiras-SP: II - Brucelose. **Ars Veterinaria**, v. 12, n. 2, p. 137-140, 1996.

CAPÍTULO 3 - FATORES ASSOCIADOS À PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE BOVINA NOS MUNICÍPIOS DE ALTINÓPOLIS E SANTO ANTONIO DA ALEGRIA, ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar fatores associados à taxa de prevalência da brucelose bovina, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo. Analisaram-se 1.459 soros sangüíneos, de 132 rebanhos, colhidos aleatoriamente, submetidos às provas de soroaglutinação em placa e antígeno acidificado tamponado como triagem, e os positivos submetidos à reação de fixação de complemento (RFC). Considerou-se reagente o animal com título a partir de 4 na RFC e infectado o rebanho com pelo menos um animal com esse título. Aplicou-se um questionário para obter informações sobre: idade do animal, sexo, finalidade da exploração, área da propriedade, tamanho do rebanho, quantidade de leite produzido, idade do proprietário, grau de instrução do proprietário, se o proprietário era ou não o responsável pelo manejo, disponibilidade de orientação técnica, realização regular de exame de brucelose, uso de vacina contra brucelose, exigência de atestado negativo de brucelose ao adquirir animais, uso de piquete-maternidade, compra de animais em leilão, fonte de água para dessedentação dos animais, uso de inseminação artificial, uso de transferência de embriões e sistema de criação. Para a comparação das taxas de prevalência de acordo com os fatores considerados usou-se a metodologia de estudos seccionais. A idade e o sexo dos animais estiveram associados à ocorrência da enfermidade. Os animais com idade mais avançada e as fêmeas apresentaram mais chance de serem infectados. A característica do rebanho que demonstrou associação inequívoca com a maior ocorrência de brucelose foi o fato de adquirir animais sem exigir exame de negativo para brucelose.

Palavras-Chave: Estudo seccional, fixação de complemento, risco relativo

1- Introdução

Diversos fatores podem estar associados a um maior ou menor risco de ocorrência de brucelose nos rebanhos bovinos. De acordo com NICOLETTI (1980), esses fatores podem ser divididos em intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, o autor cita: idade, latência (filhas de mães infectadas), sexo, gestação e resistência individual. Entre os fatores extrínsecos, menciona: manejo do rebanho, clima, topografia e sobrevivência da bactéria.

SALMAN & MEYER (1984) também apresentam abrangente revisão sobre fatores associados à ocorrência da brucelose bovina, divididos em três grupos: características da população animal, tipo de manejo e características biológicas da enfermidade. Entre as características da população animal, os autores incluem: tamanho do rebanho, densidade populacional, animais puros ou cruzados e finalidade (carne ou leite). Como tipo de manejo, os autores incluem os seguintes fatores: uso de inseminação artificial, uso de instalações para maternidade, contato entre rebanhos, contato com rebanhos vizinhos infectados, fonte de reposição de animais e tipos de instalações. As características biológicas da enfermidade abrangem: imunidade do rebanho, persistência da infecção em bezerras e vacinação.

As vacas constituem a categoria mais susceptível à brucelose, principalmente as vacas em gestação. Os touros também são susceptíveis, porém mais resistentes que as fêmeas. Além da idade e do sexo, existe variação de susceptibilidade individual, pois mesmo em rebanhos com elevada taxa de prevalência há animais que não se infectam (ACHA & SZYFRES, 2001). Relação entre idade e maior porcentagem de animais reagentes foi observada por SILVA et al. (2000), no Sri Lanka, em bovinos e bubalinos; os autores observaram também que animais criados em sistema extensivo tinham maior probabilidade de serem reagentes.

Analisando dados de um estudo sobre brucelose bovina realizado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, ANSELMO & PAVEZ (1977) verificaram que a taxa de prevalência era maior em rebanhos vacinados e em rebanhos maiores, e não

observaram diferença entre os sistemas de criação intensivo, semi-intensivo e extensivo, e entre as finalidades da exploração, carne, leite ou mista.

Essa maior ocorrência de brucelose em rebanhos vacinados é uma observação aparentemente paradoxal, que contraria os achados de VANDERWAGEN et al. (1977), apesar de KELLAR et al. (1976) e MARTIN & GERROW (1978) terem concluído que a vacinação por si só parece não contribuir significativamente para uma diferença nas taxas de prevalência.

SALMAN et al. (1984), estudando o rebanho bovino de uma região do México, examinaram 28 variáveis potencialmente associadas à brucelose e constataram que aquelas que contribuíram, positiva ou negativamente, para a ocorrência da enfermidade foram: área da propriedade, porcentagem de animais inseminados artificialmente, comercialização local dos produtos, quantidade de investimento na atividade pecuária, produção de leite como principal atividade e descarte de animais reagentes para brucelose.

Outros fatores relacionados ao manejo do rebanho também podem estar associados à ocorrência da enfermidade. O uso de piquete-maternidade apresenta vantagens e desvantagens, estando claro que a medida que mais contribuiria para diminuir o risco de transmissão da enfermidade seria a parição em baias individuais, conforme observaram VANDERWAGEN et al. (1978). SALMAN et al. (1984), no estudo realizado no México, não constataram efeito desse fator na porcentagem de rebanhos infectados.

Uma vez que touros infectados dificilmente transmitem a brucelose (THOMSEN, 1943) e que sêmen de touro infectado pode resultar em transmissão da enfermidade para vacas susceptíveis por meio da inseminação artificial (MANTHEI et al., 1950), o uso dessa técnica pode ter efeitos favoráveis ou desfavoráveis sobre a taxa de prevalência de brucelose, em função dos cuidados adotados.

Também se pode afirmar que a técnica de transferência de embriões tem potencial para contribuir para uma redução na ocorrência de brucelose, pois a enfermidade não é transmitida dessa forma, mesmo sendo a doadora infectada,

conforme demonstra uma série de pesquisas revisadas por STRINGFELLOW & WRIGHT (1989).

Além dos fatores mencionados, é importante adicionar o efeito dos fatores socioeconômicos, como grau de instrução do proprietário e acesso a orientação técnica, por exemplo, sobre a taxa de prevalência da brucelose bovina. SALMAN et al. (1984), no México, não constataram efeito significativo do uso de serviços veterinários e do número de visitas feitas pelo veterinário sobre a proporção de rebanhos reagentes para brucelose.

Uma vez que não há na literatura recente trabalhos abrangentes desenvolvidos no Brasil com este propósito, a presente investigação teve por objetivo identificar fatores que eventualmente possam estar associados à taxa de prevalência da brucelose bovina, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo.

2- Material e Métodos

2.1- População estudada

A população estudada está descrita no item 2.1 do Capítulo 2.

2.2- Amostra Examinada

Foram examinados 1.459 animais, cujos sangues foram obtidos por punção da veia jugular, conforme está descrito no item 2.3 do Capítulo 2.

2.3- Técnicas sorológicas

Todos os soros foram submetidos inicialmente à prova do antígeno acidificado tamponado (ALTON et al., 1988) e à prova de soroaglutinação em placa (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1968). Todos os soros reagentes em uma dessas

provas foram também examinados por meio da reação de fixação de complemento, de acordo com a técnica de ALTON et al. (1988).

Os detalhes dessas técnicas estão descritos no item 2.5 do Capítulo 2.

2.4- Características dos animais e dos rebanhos examinados

Quando da colheita das amostras de sangue, foram obtidos dados a respeito dos animais e das propriedades, de modo a detectar fatores que eventualmente possam estar associados à prevalência da brucelose na população estudada. Esses dados foram obtidos por meio de um questionário (Anexo 1), sendo as informações fornecidas pelo proprietário ou pelo responsável pelo rebanho.

2.5- Análise estatística

Para a comparação das taxas de prevalência de acordo com os fatores considerados foi utilizado o procedimento para análise de dados de estudos seccionais, com cálculo do risco relativo (razão de prevalências), do risco atribuível e do risco atribuível populacional (ALMEIDA FILHO & ROUQUAYROL, 1992). O intervalo de confiança do risco relativo foi obtido empregando a metodologia preconizada por SCHWABE et al. (1977). As taxas de prevalência em função dos fatores estudados foram também analisadas pelo teste de qui-quadrado (BERQUÓ et al., 1980).

3- Resultados

A comparação entre as proporções de animais reagentes e não reagentes na reação de fixação de complemento, de acordo com as características dos animais, está apresentada nas Tabelas de 1 a 3, com um resumo dos resultados dessas análises na Tabela 20.

Dos 1.039 animais com idade superior a 48 meses, 4,04% apresentaram reação positiva para brucelose, enquanto a taxa de prevalência entre os animais com idade de 24 a 48 meses foi 1,90% (Tabela 1).

Embora a taxa entre o primeiro grupo tenha sido maior que o dobro da taxa entre o segundo grupo, essa diferença não foi significativa, com 95% de probabilidade, de acordo com o teste de qui-quadrado, embora o valor de X^2 (3,51) estivesse próximo do limiar de significância estatística (3,84). A relação entre essas duas taxas de prevalência resultou em um risco relativo de 2,12, com um intervalo de confiança de 1,01 a 4,46, significando que, com 95% de probabilidade, a taxa de prevalência observada nos animais acima de 48 meses é superior à taxa de prevalência observada nos animais com 24 a 48 meses de idade. O risco atribuível, ou diferença de prevalências, resultou em 2,14%, enquanto o risco atribuível populacional foi de 44,61% (Tabela 20).

O teste sorológico resultou em 50 fêmeas positivas, ou seja, 3,53%, entre as 1.415 examinadas, ao passo que dos 44 machos examinados nenhum foi positivo (Tabela 2). Não foi possível calcular o risco relativo, uma vez que a taxa de prevalência de um dos grupos foi zero. O risco atribuível foi 3,53%, e o risco atribuível populacional foi 100,00%, mas, de acordo com o teste de qui-quadrado, a diferença entre as duas taxas não é significativa ($p > 0,05$), conforme os dados da Tabela 20.

Os animais destinados à produção leiteira tiveram uma taxa de prevalência de 4,26%, enquanto os animais de produção mista tiveram uma taxa de 3,03% (Tabela 3), mas essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,40, mas o intervalo de confiança ficou entre 0,81 e 2,42. O risco atribuível foi 1,23%, e o risco atribuível populacional foi 11,66% (Tabela 20).

Nas Tabelas de 4 a 19 encontra-se a comparação entre as proporções de rebanhos com e sem pelo menos um animal reagente, de acordo com características do rebanho, da propriedade ou do proprietário. Um resumo dessas análises encontra-se na Tabela 21.

Das 39 propriedades com área de até 30 hectares, 20,51% possuíam pelo menos um animal reagente, enquanto nas propriedades com área superior a 30

hectares a proporção de rebanhos infectados foi 15,05% (Tabela 4); essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo, ou seja, a relação entre essas duas taxas, foi 1,36, com um intervalo de confiança de 0,62 a 2,98, o risco atribuível foi 5,46%, e o risco atribuível populacional foi 9,72% (Tabela 21).

A análise dos dados de acordo com o número de animais que compõem o rebanho mostra uma taxa de 20,75% de rebanhos com pelo menos um animal infectado entre aqueles com mais de 50 animais e uma taxa de 13,92% entre os rebanhos compostos por até 50 animais (Tabela 5); essa diferença também não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,49 (intervalo de 0,68 a 3,29), o risco atribuível foi 6,83%, e o risco atribuível populacional foi 16,50% (Tabela 21).

Nos rebanhos com produção leiteira superior a 200 litros diários a frequência de rebanhos com animais reagentes foi 26,32%, e naqueles com produção diária de até 200 litros a taxa foi 15,04% (Tabela 6); a diferença entre essas duas taxas não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,75, intervalo de confiança de 0,73 a 4,18, o risco atribuível foi 11,28%, e o risco atribuível populacional foi 9,78%.

Analizando a frequência de rebanhos infectados conforme a idade do proprietário, observa-se que 21,05% dos rebanhos de proprietários com idade superior a 50 anos tinham pelo menos um animal reagente na amostra examinada, ao passo que entre os rebanhos de proprietários com idade até 50 anos a frequência foi 10,71% (Tabela 7). Entretanto essa diferença não foi significativa no teste de qui-quadrado ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,97, com intervalo entre 0,82 e 4,71, o risco atribuível foi 10,34%, e o risco atribuível populacional foi 35,75% (Tabela 21).

Entre os rebanhos cujos proprietários possuíam apenas grau de instrução fundamental, a taxa de prevalência foi 18,75%, e nos rebanhos de proprietários com instrução média ou superior a taxa foi 13,46% (Tabela 8), diferença essa sem significância estatística ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,39, com intervalo de 0,61 a 3,18, risco atribuível 5,29% e risco atribuível populacional 19,26% (Tabela 21).

No grupo de rebanhos cujos proprietários eram os responsáveis diretos pelo manejo, a taxa de rebanhos infectados foi 18,31%, e nos rebanhos cujo manejo ficava a cargo de outras pessoas a taxa foi 14,75% (Tabela 9), diferença desprovida de

significância estatística ($p > 0,05$). O risco relativo foi apenas 1,24, com intervalo de confiança entre 0,57 e 2,70, o risco atribuível foi 3,56%, e o risco atribuível populacional foi 11,52% (Tabela 21).

A taxa de prevalência de rebanhos infectados entre aqueles que dispunham de algum tipo de orientação técnica foi 16,81%, enquanto entre os rebanhos sem orientação técnica a taxa foi 15,79% (Tabela 10); essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,06 (0,35 - 3,24), o risco atribuível foi 1,02%, e o risco atribuível populacional foi 5,28% (Tabela 21).

Nas propriedades que faziam exame de brucelose regularmente, a proporção de rebanhos infectados foi 17,86%, e naquelas que não faziam, a proporção foi 15,79% (Tabela 11), diferença não significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,13, com intervalo de 0,53 a 2,43, o risco atribuível foi 2,07%, e o risco atribuível populacional foi 5,28% (Tabela 21).

Entre os proprietários que declararam vacinar os animais contra brucelose, a taxa de rebanhos reagentes foi 21,05%, e entre os rebanhos sem vacinação a taxa foi 5,41% (Tabela 12). De acordo com o teste de qui-quadrado essa diferença não é significativa ($p < 0,05$). O risco relativo foi 3,89, com intervalo de 0,96 a 15,82, o risco atribuível foi 15,64%, e o risco atribuível populacional foi 67,55% (Tabela 21).

Nos rebanhos cujos proprietários não exigiam exame de brucelose para a aquisição de animais a prevalência de rebanhos infectados foi 37,21%, enquanto nos rebanhos em que era feita essa exigência a taxa foi 6,74% (Tabela 13); essa diferença foi significativa, pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,01$). O risco relativo foi 5,52 (intervalo entre 2,32 e 13,11), o risco atribuível a esse fator foi 30,47%, e o risco atribuível populacional foi 59,57% (Tabela 21).

Nos rebanhos que não adotavam o uso de piquete-maternidade, a taxa de prevalência foi 17,05%, e nos que adotavam, a taxa foi 15,91% (Tabela 14), diferença que resultou não significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,07, com intervalo de 0,47 a 2,43, o risco atribuível foi 1,14%, e o risco atribuível populacional foi 4,56% (Tabela 21).

A taxa de prevalência de rebanhos infectados entre aqueles cujos proprietários afirmaram não comprar animais em leilão foi 16,81%, e entre aqueles que afirmaram comprar animais em leilão a taxa foi 15,79% (Tabela 15); essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,06 (0,35 a 3,24), o risco atribuível foi 1,02%, e o risco atribuível populacional foi 5,28% (Tabela 21).

Entre os rebanhos que usavam mina ou córrego como fonte de água para os animais a taxa de prevalência foi 16,67%, e entre aqueles que usavam outra fonte, como poço artesiano ou água de estação de tratamento urbano, a taxa também foi 16,67% (Tabela 16). Não houve diferença entre as taxas ($p > 0,05$), o risco relativo foi 1,00 (0,37 a 2,69), o risco atribuível foi zero, assim como o risco atribuível populacional (Tabela 21).

Nos rebanhos que não usavam inseminação artificial, a prevalência foi 17,21%, e nos rebanhos que usavam esse recurso a taxa foi 10,00% (Tabela 17), mas essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 1,72, com intervalo de 0,26 a 11,50, o risco atribuível foi 7,21%, e o risco atribuível populacional foi 40,01% (Tabela 21).

Dos 132 rebanhos examinados, 128 não usavam a transferência de embriões, e desses, 17,19% possuíam pelo menos um animal reagente para brucelose, enquanto entre os quatro rebanhos que adotavam o uso dessa tecnologia nenhum possuía animal reagente (Tabela 18). Não foi possível calcular o risco relativo; o risco atribuível foi 17,97%, e o risco atribuível populacional foi 100,00%, mas pelo teste exato de Fisher a diferença observada não foi significativa (Tabela 21).

Entre os rebanhos criados em sistema semi-intensivo, a taxa foi 24,49%, e entre os de sistema extensivo, 12,05% (Tabela 19); essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O risco relativo foi 2,03 (0,95 - 4,35), o risco atribuível foi 12,44%, e o risco atribuível populacional foi 27,71% (Tabela 21).

Tabela 1- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo ≥ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com a faixa etária dos animais, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Faixa etária (meses)	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
> 48	42	4,04	997	95,96	1.039
24 a 48	8	1,90	412	98,10	420
Total	50	3,43	1.409	96,57	1.459

Tabela 2- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo ≥ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com o sexo dos animais, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Sexo	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Fêmea	50	3,53	1.365	96,47	1.415
Macho	0	0,00	44	100,00	44
Total	50	3,43	1.409	96,57	1.459

Tabela 3- Resultado da reação de fixação de complemento (positivo ≥ 4) para diagnóstico de brucelose, de acordo com a finalidade da exploração, em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Finalidade	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Leite	20	4,26	450	95,74	470
Mista	30	3,03	959	96,97	989
Total	50	3,43	1.409	96,57	1.459

Tabela 4- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a área de propriedade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Área (ha)	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
≤ 30	8	20,51	31	79,49	39
> 30	14	15,05	79	84,95	93
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 5- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o número de animais do rebanho, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Número de animais	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
> 50	11	20,75	42	79,25	53
1 a 50	11	13,92	68	86,08	79
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 6- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a produção diária de leite, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Produção diária de leite	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
> 200 litros	5	26,32	14	73,68	19
0 a 200 litros	17	15,04	96	84,96	113
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 7- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a faixa etária do proprietário, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Idade (ano)	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
> 50	16	21,05	60	78,95	76
até 50	6	10,71	50	89,29	56
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 8- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o grau de escolaridade do proprietário, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Grau de escolaridade	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Fundamental	15	18,75	65	81,25	80
Médio/Sup.	7	13,46	45	86,54	52
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 9- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de o proprietário ser ou não o responsável pelo manejo, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Proprietário responsável	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Sim	13	18,31	58	81,69	71
Não	9	14,75	52	85,25	61
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 10- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de a propriedade dispor ou não de orientação técnica, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Orientação técnica	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Sim	19	16,81	94	83,19	113
Não	3	15,79	16	84,21	19
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 11- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de fazer ou não exame de brucelose regularmente, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Exame de brucelose	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Sim	10	17,86	46	82,14	56
Não	12	15,79	64	84,21	76
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 12- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de vacina contra brucelose, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Vacina brucelose	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Sim	20	21,05	75	78,95	95
Não	2	5,41	35	94,59	37
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 13- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de exigir ou não exame negativo de brucelose antes de introduzir animais novos no rebanho, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Exige exame	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Não	16	37,21	27	62,79	43
Sim	6	6,74	83	93,26	89
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 14- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de usar ou não piquete-maternidade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Piquete-maternidade	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Não	15	17,05	73	82,95	88
Sim	7	15,91	37	84,09	44
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 15- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o fato de comprar ou não animais em leilão, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Compra em leilão	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Não	19	16,81	94	83,19	113
Sim	3	15,79	16	84,21	19
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 16- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com a fonte de água para os animais da propriedade, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Fonte de água	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Outra	4	16,67	20	83,33	24
Mina/córrego	18	16,67	90	83,33	108
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 17- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de inseminação artificial (IA), nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Uso de IA	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Não	21	17,21	101	82,79	122
Sim	1	10,00	9	90,00	10
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 18- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o uso ou não de transferência de embrião (TE), nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Uso de TE	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Não	22	17,19	106	82,81	128
Sim	0	0,00	4	100,00	4
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 19- Rebanhos bovinos com e sem animal com diagnóstico positivo (reação de fixação de complemento ≥ 4) para brucelose, de acordo com o sistema de criação, nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Sistema de criação	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
Semi-intens.	12	24,49	37	75,51	49
Extensivo	10	12,05	73	87,95	83
Total	22	16,67	110	83,33	132

Tabela 20 - Risco relativo (RR), intervalo de confiança do risco relativo (IC), risco atribuível (RA), risco atribuível populacional (RAP), qui-quadrado (X^2) e significância estatística (p) observados conforme as características estudadas em bovinos (n = 1.459) dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Característica	Tabela	RR	IC	RA (%)	RAP (%)	X^2	p
Idade	1	2,12	1,01 - 4,46	2,14	44,61	3,51	> 0,05
Sexo	2	-	-	3,53	100,00	0,72	> 0,05
Finalidade	3	1,40	0,81 - 2,42	1,23	11,66	0,74	> 0,05

- Não foi possível calcular.

Tabela 21 - Risco relativo (RR), intervalo de confiança do risco relativo (IC), risco atribuível (RA), risco atribuível populacional (RAP), qui-quadrado (χ^2) e significância estatística (p) observados conforme as características da propriedade, do proprietário ou do rebanho bovino estudado (n = 132) nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

Característica	Tabela	RR	IC	RA (%)	RAP (%)	χ^2	p
Área	4	1,36	0,62 - 2,98	5,46	9,72	0,26	> 0,05
Número animais	5	1,49	0,68 - 3,29	6,83	16,50	0,63	> 0,05
Produção leite	6	1,75	0,73 - 4,18	11,28	9,78	0,79	> 0,05
Idade proprietário	7	1,97	0,82 - 4,71	10,34	35,75	1,79	> 0,05
Escolaridade proprietário	8	1,39	0,61 - 3,18	5,29	19,26	0,31	> 0,05
Proprietário - manejo	9	1,24	0,57 - 2,70	3,56	11,52	0,10	> 0,05
Orientação técnica	10	1,06	0,35 - 3,24	1,02	5,28	0,05	> 0,05
Exame brucelose regular	11	1,13	0,53 - 2,43	2,07	5,28	0,006	> 0,05
Vacinação brucelose	12	3,89	0,96 - 15,82	15,64	67,55	3,63	> 0,05
Exame compra	13	5,52	2,32 - 13,11	30,47	59,57	17,25	< 0,01
Piquete-maternidade	14	1,07	0,47 - 2,43	1,14	4,56	0,007	> 0,05
Compra em leilão	15	1,06	0,35 - 3,24	1,02	5,28	0,05	> 0,05
Fonte de água	16	1,00	0,37 - 2,69	0,00	0,00	0,09	> 0,05
Uso de I.A.	17	1,72	0,26 - 11,50	7,21	40,01	0,02	> 0,05
Uso de T.E.	18	-	-	17,19	100,00	-	0,48*
Sistema criação	19	2,03	0,95 - 4,35	12,44	27,71	2,60	> 0,05

- Não foi possível calcular.

* Determinada pelo teste exato de Fisher.

4- Discussão

Após longo tempo de convivência com a brucelose bovina praticamente pelo mundo todo, muito do comportamento epidemiológico da enfermidade já é conhecido, e pesquisadores têm apontado diversos fatores de risco associados com a ocorrência da doença, embora seja necessário considerar que o grande número de fatores envolvidos e a interação entre esses fatores dificulta sobremaneira a avaliação de sua influência.

A influência desses fatores, distribuídos por SALMAN & MEYER (1984) em três categorias, características da população animal, características do manejo e características biológicas da doença, varia muito conforme as investigações realizadas e conforme as áreas estudadas, devendo certamente sofrer também influência de

fatores socioeconômicos, que, obviamente, apresentam grande variação de acordo com as características culturais das diferentes populações ao redor do mundo.

Essa diversidade de fatores associada à complexidade incrementada pelas múltiplas interações talvez expliquem por que, às vezes, fatores lógicos e esperadamente associados à maior ocorrência da infecção não se concretizam em determinada investigação.

Das três características dos animais estudadas neste trabalho (idade, sexo e finalidade da exploração), a idade foi o fator que se apresentou mais associado a maior taxa de prevalência. O risco relativo obtido foi 2,12, indicando que animais com idade acima de 48 meses tiveram praticamente o dobro do risco de serem reagentes, quando comparados com animais de 24 a 48 meses de idade (Tabelas 1 e 20). O intervalo de confiança do risco relativo foi de 1,01 a 4,46, indicando haver 95% de probabilidade de maior risco dos animais com mais idade serem reagentes, em relação aos mais jovens, nas categorias estudadas, apesar de o resultado do teste de qui-quadrado (3,51) ter ficado ligeiramente abaixo do limiar de significância estatística (3,84). A associação entre idade e maior taxa de prevalência de brucelose está de acordo com o que seria esperado e de acordo com as afirmações de ACHA & SZYFRES (2001), pois, por se tratar de uma doença crônica, com o título sorológico persistindo praticamente ao longo da vida do animal, quanto maior o tempo de vida, maior a probabilidade do animal entrar em contato com o agente etiológico. Em consonância com isso, SILVA et al. (2000), estudando rebanhos bovinos e bubalinos no Sri Lanka, verificaram maior probabilidade de ocorrência de brucelose em animais acima de três anos de idade.

Apesar de a análise estatística não ter apontado diferença significativa entre as taxas de prevalência de acordo com o sexo, verificou-se que 3,53% das 1.415 fêmeas examinadas foram reagentes, enquanto nenhum dos 44 touros examinados apresentou título sorológico; o cálculo do risco atribuível aponta que toda a taxa de prevalência observada pode ser atribuída ao fator sexo feminino (Tabelas 2 e 20). Essa diferença encontra respaldo no fato de as vacas, principalmente aquelas em gestação, serem a categoria mais susceptível à infecção por *B. abortus* (ACHA & SZYFRES, 2001).

A análise das taxas de prevalência de acordo com a finalidade do animal (4,26% para os animais de finalidade leiteira e 3,03% para os de finalidade mista) não apontou diferença significativa (Tabelas 3 e 20). ANSELMO & PAVEZ (1977), analisando dados levantados pelo Ministério da Agricultura no Brasil, não observaram diferenças bem definidas entre animais destinados à produção de leite, à produção de carne e à produção mista, ao passo que SALMAN et al. (1984), em um estudo sobre a brucelose bovina em uma região do México, constataram menor ocorrência de soropositividade em rebanhos cuja principal atividade era a exploração leiteira.

A porcentagem de rebanhos com pelo menos um animal reagente entre as propriedades com até 30 hectares foi 20,51, e entre as propriedades com mais de 30 hectares, 15,05, mas essa diferença não foi significativa (Tabelas 4 e 21). Já a análise de acordo com o número de animais do rebanho revelou maior taxa de rebanhos infectados entre aqueles com mais de 50 animais (20,75%) do que entre aqueles com 1 a 50 animais, embora essa diferença também não tenha sido significativa (Tabelas 5 e 21). De acordo com SALMAN & MEYER (1984), quando rebanhos maiores são infectados, uma maior proporção de animais se infecta, e a doença é mais difícil de ser erradicada, embora o tamanho do rebanho provavelmente não seja a única variável a contribuir para essa diferença, que deve ser influenciada por outros fatores, como por exemplo a densidade de animais no rebanho. ANSELMO E PAVEZ (1977), no Brasil, constataram que, com raras exceções, a taxa de prevalência aumentava com o tamanho do rebanho, e SAMAN et al. (1984) também observaram relação entre maior prevalência e maior tamanho de rebanho quando estudaram a brucelose bovina em uma região do México, concordando ainda com o relato de NICOLETTI (1980).

Entre as propriedades com produção leiteira acima de 200 litros diários a taxa de rebanhos infectados foi 26,32%, enquanto entre aqueles com produção de até 200 litros a taxa foi 15,04%, mas a diferença não foi significativa (Tabelas 6 e 21). É possível que esse fator, no presente estudo, esteja relacionado com os aspectos comentados no parágrafo anterior, pois a quantidade de leite produzido geralmente guarda relação com o tamanho do rebanho.

É de se admitir que determinadas características do proprietário possam influir sobre a maior ou menor prevalência da infecção. No entanto, não se observou influência significativa destas características: idade, grau de escolaridade e o fato do proprietário ser responsável pelo manejo. Entre os rebanhos cujos proprietários tinham mais de 50 anos, 21,05% tinham pelo menos um animal reagente, enquanto entre aqueles cujos proprietários tinham até 50 anos a taxa foi 10,71%, o que resulta em um risco relativo de 1,97, ou seja, quase o dobro de risco para o primeiro grupo, mas, como o intervalo de confiança atinge valor inferior a 1, essa diferença não é considerada significativa, o que foi confirmado pelo teste de qui-quadrado (Tabelas 7 e 21). A prevalência de rebanhos infectados foi maior entre aqueles cujos proprietários tinham menor grau de instrução, porém a diferença não foi significativa (Tabelas 8 e 21), e entre os rebanhos cujos proprietários são responsáveis pelo manejo a taxa foi maior, porém sem diferença significativa (Tabelas 9 e 21).

A disponibilidade de orientação técnica também não influenciou na porcentagem de rebanhos infectados (Tabelas 10 e 21). Concordando com esta constatação, SALMAN et al. (1984), no México, verificaram que o uso de serviços veterinários e o número de visitas feitas pelo veterinário não tiveram influência sobre a taxa de reagentes, provavelmente porque os veterinários eram chamados para outros serviços, e não por problemas relacionados com a brucelose. Tal fato também pode ter sido verificado no presente trabalho, uma vez que a assistência técnica declarada pelo proprietário provavelmente não estava relacionada com orientações sobre a profilaxia da brucelose bovina.

Os responsáveis por 56 (42,42%) dos 132 rebanhos declararam fazer exame de brucelose regularmente, e entre esses rebanhos 17,86% tinham animal positivo; já entre os 76 (57,58%) que declaram não fazer exame regularmente a taxa foi 15,79%. Essa diferença não foi significativa (Tabelas 11 e 21). Esses resultados indicam que, apesar de fazerem exames, essas propriedades não estão descartando os animais infectados, pois, de acordo com SALMAN et al. (1984), quanto maior o tempo que o animal infectado permanece no rebanho, maior a porcentagem de animais reagentes

Segundo informações dos responsáveis, 95 (71,97%) dos 132 rebanhos vacinavam as bezerras contra brucelose, ao passo que 37 (28,03%) não adotavam essa vacinação. Os resultados obtidos mostram uma taxa de 21,05% de rebanhos infectados entre os que declararam vacinar e uma taxa de 5,41% entre os que declararam não vacinar. Essa diferença não foi significativa, mas o valor de qui-quadrado (3,63) ficou próximo do limiar de significância (3,87), com 95% de probabilidade (Tabelas 12 e 21). Embora paradoxal, essa maior prevalência em rebanhos vacinados foi também constatada por ANSELMO & PAVEZ (1977). Segundo SALMAN & MEYER (1984), o uso da vacina como medida profilática para prevenir a disseminação da brucelose é controverso. Em um estudo retrospectivo envolvendo 79 rebanhos leiteiros na Califórnia, VANDERWAGEN et al. (1977) concluíram que a quantidade de animais que se tornaram reagentes em um rebanho não vacinado foi oito vezes a quantidade observada em um rebanho vacinado. Por outro lado, KELLAR et al. (1976) e MARTIN & GERROW (1978) concluíram que a vacinação por si só parece não influenciar significativamente. Nos dados do presente trabalho, a taxa de rebanhos vacinados infectados foi 3,89 vezes a taxa de rebanhos não vacinados infectados, embora o limite inferior do intervalo de confiança desse risco relativo tenha sido ligeiramente inferior a 1,0 (0,96). Apesar de desprovida de significância estatística, essa diferença apresenta-se paradoxalmente elevada a favor dos rebanhos não vacinados. Pode-se admitir que resíduos da resposta sorológica à vacina B 19 estejam influenciando nesses resultados, mas isso é pouco provável, uma vez que foram examinados apenas animais adultos, que, na sua grande maioria, não deveriam ter mais títulos significativos de anticorpos vacinais. Outra explicação que não pode deixar de ser mencionada é a possibilidade de resposta inadequada, por parte dos responsáveis pelos rebanhos, ao questionário aplicado. O convívio no campo mostra uma dificuldade por parte dos produtores menos esclarecidos de distinguir entre as vacinações contra as diversas enfermidades, o que leva à suposição de que, ao responder à questão, o produtor possa, na verdade, estar fazendo alusão a outra vacina, contra febre aftosa, por exemplo, que é de uso obrigatório; aliada à possibilidade de equívoco há a possibilidade do receio de admitir a não-adoção de uma

prática sanitária recomendável. Essas duas possibilidades são reforçadas pelo fato de 71,97% dos responsáveis pelos rebanhos terem declarado que usam a vacina contra brucelose, porcentagem que parece elevada, contra 28,03% que declararam não usar, principalmente se for considerado que quando da aplicação do formulário essa vacinação ainda não era obrigatória. Na investigação realizada no México, SALMAN et al. (1984) observaram que tão poucos rebanhos vacinavam contra brucelose que não foi possível tirar uma conclusão sobre a influência dessa variável.

Dos fatores de risco analisados neste trabalho, a exigência de exame negativo de brucelose para a aquisição de animais foi aquele que apresentou maior significância estatística: risco relativo 5,52 (2,32 a 13,11) e qui-quadrado 17,25 ($p < 0,01$), conforme consta nas Tabelas 13 e 21. O fato da taxa de prevalência de rebanhos infectados entre os que não exigem exame na compra de animais ter sido cinco vezes a taxa observada entre os rebanhos que exigem exame mostra com clareza a importância da adoção dessa medida. Esses resultados são compatíveis com a afirmação de SALMAN & MEYER (1984) de que a reposição com animais infectados representa um dos principais fatores associados à introdução de brucelose em rebanho livre.

No presente trabalho não se observou influência do uso de piquete-maternidade na taxa de rebanhos infectados (Tabelas 14 e 21). SALMAN & MEYER (1984), no México, também não observaram influência desse fator. Com o uso de piquete-maternidade pode-se imaginar um efeito positivo para evitar a disseminação da doença porque evita-se que o animal eventualmente infectado venha a parir ou abortar onde está o restante do rebanho, contaminando a pastagem e expondo os outros animais ao risco. Entretanto é preciso considerar a possibilidade de no piquete-maternidade também haver animais infectados e animais não infectados; nesse último caso, o risco de disseminação apresenta-se elevado, pois o animal em final de gestação e supostamente não infectado constitui a categoria animal de maior susceptibilidade à infecção, além de que com a adoção do piquete-maternidade, na hipótese de um animal infectado parir ou abortar, a carga de contaminação será muito maior do que seria em uma área mais ampla, dada a maior concentração, o que implica maior risco de transmissão da enfermidade. Isso é confirmado pelas observações de

VANDERWAGEN et al. (1978) segundo as quais rebanhos que adotaram o uso de baias individuais por ocasião do parto tiveram maior sucesso na erradicação da brucelose bovina. Do ponto de vista de prevenção da brucelose, esse seria o procedimento ideal de manejo de parições, embora seja de difícil implementação na maioria das propriedades, pela infra-estrutura exigida e pelo aumento dos custos.

Supostamente, a compra de animais em leilão pode representar um risco de introdução de brucelose no rebanho, uma vez que se trata de um tipo de comercialização que não permite a imposição de condições, como, por exemplo, fazer exame no animal comprado, devendo o comprador, nessa circunstância, confiar no exame fornecido pelo vendedor ou pelo organizador do evento. Essa situação pode representar risco, pois não é rara a possibilidade de exame falso ou realizado sem o devido rigor técnico. No entanto, os dados deste trabalho não mostraram influência desse fator na taxa de rebanhos infectados (Tabelas 15 e 21), talvez pelo próprio fato de apenas 14,39% dos produtores terem declarado comprar animais em leilão.

O uso de água de córrego ou de mina para a dessedentação dos animais pode, teoricamente, representar maior risco de transmissão de brucelose bovina, em decorrência da maior possibilidade de contaminação dessas fontes, em comparação com outras, como água de poço ou água fornecida por estação urbana de tratamento, mas no presente trabalho não se observou essa relação, tendo a taxa de prevalência sido exatamente a mesma nos dois grupos de propriedades (Tabelas 16 e 21).

Observou-se maior porcentagem de rebanhos infectados entre aqueles que não usam inseminação artificial (17,21%) do que entre aqueles que usam (10,00%), embora essa diferença não se tenha revelado significativa (Tabelas 17 e 21). Segundo SALMAN & MEYER (1984), a comparação entre inseminação artificial e monta natural na disseminação da brucelose tem sido objeto de resultados conflitantes. A monta natural tem pequena importância na transmissão da brucelose bovina (THOMSEN, 1943), e o uso, na inseminação artificial, de sêmen de touro infectado pode transmitir a doença para vacas não infectadas (MANTHEI et al., 1950); no entanto, o uso de sêmen fornecido por empresas idôneas, que adotam rígido controle sanitário, praticamente elimina esse risco. Conforme observaram SALMAN et al. (1984), no México, a

inseminação artificial realizada sob condições precárias pode resultar em maior prevalência de brucelose, mas sendo a inseminação realizada sob condições adequadas, o resultado pode ser a redução na prevalência da enfermidade, também porque veterinários devidamente treinados para realizar a inseminação artificial adotam melhores práticas sanitárias e detectam problemas que podem estar relacionados com a ocorrência de brucelose.

Em nenhuma das quatro propriedades que usam a transferência de embriões se observou animal reagente para brucelose, ao passo que entre as que não usam, a taxa de prevalência foi 17,19% (Tabelas 18 e 21), embora a análise estatística não tenha revelado diferença significativa. Em função do pequeno número de proprietários adotando essa tecnologia (3,03%), os dados do presente trabalho não permitem uma conclusão absoluta sobre o efeito desse fator, mas os dados obtidos estão respaldados no fato de a transferência de embriões em bovinos, mesmo usando uma doadora infectada, não resultar na transmissão de brucelose (STRINGFELLOW & WRIGHT, 1989) e também no fato de que em rebanhos que adotam esse tipo de tecnologia há maior probabilidade de serem adotadas medidas sanitárias adequadas, que venham a contribuir para a diminuição na prevalência da brucelose.

A porcentagem de rebanhos infectados criados em sistema semi-intensivo (24,49%) foi o dobro da porcentagem de rebanhos infectados criados em sistema extensivo (12,05%), o que resulta em um risco relativo de 2,03, embora o limite inferior do intervalo de confiança tenha sido menor que 1,00 (0,95) e o teste de qui-quadrado tenha apontado diferença não significativa (Tabelas 19 e 21). Do ponto de vista da ocorrência de brucelose bovina, é admissível que ambos os sistemas possam apresentar vantagens e desvantagens. No sistema intensivo, a maior proximidade entre os animais e a maior concentração de eventual contaminação ambiental apontam para o favorecimento na disseminação da doença, em relação ao sistema extensivo. Por outro lado, no sistema intensivo, a proximidade dos animais e o maior contato com as pessoas que cuidam do rebanho permitem melhor e mais rápida detecção de eventuais problemas relacionados com a brucelose, como por exemplo a ocorrência de abortamento, o que possibilitaria a pronta adoção de medidas profiláticas, que

potencialmente resultariam em diminuição na ocorrência da enfermidade. ANSELMO & PAVEZ (1977) não observaram diferença entre as taxas de prevalência observadas em rebanhos criados em sistema extensivo, semi-intensivo ou intensivo, enquanto SILVA et al. (2000), no Sri Lanka, obtiveram associação entre sistema extensivo e maior ocorrência de brucelose em bovídeos.

Os resultados permitem concluir que, entre as características dos animais avaliadas no presente trabalho, a idade e o sexo estão associados à ocorrência da enfermidade. Os animais com idade mais avançada têm mais chance de serem infectados do que os mais jovens, e as fêmeas são mais freqüentemente infectadas do que os machos. Das características do rebanho, da propriedade ou do proprietário, pode-se afirmar que aquela que demonstrou associação inequívoca com a maior ocorrência de brucelose foi a aquisição de animais sem a exigência de exame de brucelose com resultado negativo para a introdução de novos animais no rebanho.

5- Referências

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. v. 1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.

ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M.Z. **Introdução à Epidemiologia moderna**. 2 ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1992. 184 p.

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

ANSELMO, F.P.; PAVEZ, M.M. Brucelose bovina. In: _____. Diagnóstico de saúde animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. p. 525-561.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1980. 325 p.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina**. Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. 9 p. (Nota Técnica n. 2, rev. 1)

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

MANTHEI, C.A.; DETRAY, D.E.; GOODE, E.R. Brucella infection in bulls and the spread of brucellosis in cattle by artificial insemination. I. Intrauterine injection. **Proceedings of the Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association**, v. 87, p. 177-184, 1950.

MARTIN, S.W.; GERROW, A.F. The use of case history studies to differentiate potentially infected from potentially noninfected herds with reactors to Brucella abortus antigens. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, p. 16-22 1978.

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

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**, v. 45, n. 8, p. 1.557-1.560, 1984.

SALMAN, M.D.; MEYER, M.E.; CRAMER, J.C. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: Results and path analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 8, p. 1.567-1.571, 1984.

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

SILVA, I.; DANGOLLA, A.; KULACHELVY, K. Seroepidemiology of *Brucella abortus* infection in bovids in Sri Lanka. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, n. 1, p. 51-59, 2000.

STRINGFELLOW, D.A.; WRIGHT, J.C. A review of the epidemiologic aspects of embryo transfer from *Brucella abortus*-infected cows. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 997-1.006, 1989.

THOMSEN, A. Does the bull spread infectious abortion in cattle? Experimental studies from 1936 to 1942. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 53, n. 3, p. 199-211, 1943.

VANDERWAGEN, L.C.; MEYER, M.E.; SHARP, J.; TAMM, E.T. Effect of changes in manegement practice at calving on pace of eradicating brucellosis in chronically infected herds. **Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v. 82, p. 70-78, 1978.

VANDERWAGEN, L.C.; SHARP, J.; MEYER, M.E. A retrospective study on the relationships of vaccination status of reactor animals, manegement practices at calving, and herd size to eradicating brucellosis in 79 dairy herds. **Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v. 81, p. 83-96, 1977.

CAPÍTULO 4 - COMPARAÇÃO ENTRE A PROVA DE SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA E A PROVA DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO COMO TESTES DE TRIAGEM NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA

RESUMO - O trabalho teve por objetivo avaliar a prova do antígeno acidificado tamponado e a prova de soroaglutinação em placa como testes de triagem no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Foram examinados 1.459 soros colhidos em rebanhos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, SP. Para a comparação entre os resultados obtidos utilizou-se o indicador kappa, e a análise estatística baseou-se no teste de qui-quadrado de McNemar. Adotando como ponto de corte na prova de soroaglutinação em placa o título 25, observou-se concordância de 94,04% entre os dois testes, com um indicador kappa 0,31 mostrando uma concordância sofrível, e diferença significativa entre os resultados dos dois testes ($p < 0,01$). Com o título 50 como ponto de corte na prova de soroaglutinação em placa a concordância foi 97,74%, kappa 0,71 (concordância boa), e a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Concluiu-se que a prova do antígeno acidificado tamponado é vantajosa em relação à prova de soroaglutinação em placa como teste de triagem para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

Palavras-Chave: *Card test*, concordância, indicador kappa, teste rosa de Bengala

1- Introdução

A maior parte dos programas de combate à brucelose baseia-se no esquema de teste e abate dos animais reagentes. Isso significa submeter todos os animais ao exame sorológico, acarretando a necessidade de examinar um número muito grande de amostras. Por essa razão, é fundamental que se disponha de um teste rápido, de fácil execução e de baixo custo, para ser usado como teste de triagem.

Vários testes já foram avaliados para essa finalidade, muitos deles baseados no princípio da aglutinação, pela facilidade de execução.

ROSE & ROEPKE (1957) avaliaram a prova de soroaglutinação em placa usando antígeno com pH 4,0 e concluíram que a aglutinação por anticorpos não específicos era inibida com essa técnica.

No início da década de 1960, visando obter um teste rápido e confiável, pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos desenvolveram um teste usando antígeno de *Brucella abortus* corado com rosa de Bengala e tamponado com um pH 3,65. Esse teste, que utilizava componentes descartáveis e podia ser realizado usando soro ou plasma, obtido com fito-hemaglutininas e anticoagulante, ficou conhecido como *brucellosis card test*. NICOLETTI (1967) avaliou o teste e relatou que todos os animais dos quais o agente etiológico havia sido isolado apresentaram reações positivas, embora reações falso-positivas tivessem sido observadas em animais vacinados com a amostra B 19 de *B. abortus*.

BRINLEY MORGAN et al. (1969) adaptaram o *card test* usando o antígeno preparado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, mas realizando o teste em lâmina, dando origem ao teste que é chamado, na literatura internacional, rosa de Bengala. Esses autores observaram maior associação entre os resultados do teste rosa de Bengala (antígeno acidificado) e os da reação de fixação de complemento do que entre os resultados do teste rosa de Bengala e os da prova de soroaglutinação. De acordo com DAVIES (1971), avaliações realizadas no Reino Unido resultaram em uma sensibilidade de 96,2% e uma especificidade de 97,1% para o teste rosa de Bengala.

A classe de imunoglobulinas envolvida na reação a esse antígeno com pH ácido foi motivo de controvérsia. CORBEL (1972) concluíram que a aglutinação estava associada apenas a imunoglobulinas da subclasse IgG1, e que a IgM não participava da reação. BEH (1973), embora confirmando a importância da IgG1, observaram também aglutinação associada com IgG2 e IgM, o que está de acordo com as observações de LEVIEUX (1974), que também verificou que a IgM participa da reação. Contrariamente às constatações de CORBEL (1972), ALLAN et al. (1976) observaram

que o teste rosa de Bengala detecta IgM de maneira mais eficiente do que detecta IgG1 e IgG2.

A respeito do mecanismo de ação, CORBEL (1973) comprovaram que a especificidade da aglutinação do teste rosa de Bengala está associada à diminuição do pH e que o corante rosa de Bengala não desempenha papel especial, a não ser por propiciar melhor observação dos grumos de aglutinação.

Ao desenvolver um teste mais específico, que supostamente excluía a aglutinação por IgM, a intenção era evitar a reação de anticorpos resultantes da vacinação com *B. abortus* amostra B 19 sem interferir com a reação provocada por anticorpos resultantes da infecção. Entretanto, apesar da obtenção de um teste mais específico do que a soroaglutinação, o objetivo de diferenciar reação vacinal não foi atingido, como demonstraram NICOLETTI (1967) e BRINLEY MORGAN et al. (1969).

Uma vez que diversos trabalhos confirmaram a confiabilidade desse teste (NICOLETTI, 1967; BRINLEY MORGAN et al., 1969; DAVIES, 1971; O'REILLY & CUNNINGHAM, 1971), muitos programas oficiais de combate à brucelose bovina passaram a adotá-lo, tanto é que a maioria dos países desenvolvidos que conseguiram sucesso no combate à doença utilizaram o teste rosa de Bengala como método de triagem, e em seguida os soros positivos nesse teste eram submetidos à fixação de complemento, usada como prova confirmatória.

No Brasil, até há pouco tempo, o uso do teste rosa de Bengala não era muito difundido, sendo mais comum o uso da prova de soroaglutinação em placa. Entretanto, é importante considerar que não é rara a observação de animais infectados que não reagem na prova de soroaglutinação, ou então apresentam títulos insignificantes (ALTON et al., 1975; MATHIAS, 1996). Desse modo, o uso da prova de soroaglutinação isoladamente, ou o uso dessa prova como teste de triagem, pode deixar que animais infectados continuem no rebanho, dificultando a evolução de um programa de erradicação da doença.

Esse problema deverá ser minimizado com a instituição do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2001), que

prevê o uso da prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT - nome adotado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como prova de triagem.

Com a adoção dessa prova pelo programa oficial de combate à brucelose bovina no Brasil, é importante avaliar seu desempenho, em comparação com a prova de soroaglutinação em placa, como teste na triagem para o diagnóstico sorológico dessa enfermidade no Brasil.

2- Material e Métodos

2.1- Soros examinados

Foram examinados 1.459 soros sangüíneos de bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, obtidos aleatoriamente, conforme descrito no item 2.3 do Capítulo 2.

2.2- Provas sorológicas

Todos os soros foram submetidos à prova do antígeno acidificado (ALTON et al., 1988) e à prova de soroaglutinação em placa (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1968). Os resultados da PAAT, divididos em positivos e negativos, foram comparados com os resultados da prova de soroaglutinação em placa.

Os detalhes para a realização desses testes sorológicos estão descritos no item 2.5 do Capítulo 2.

2.3- Análise estatística

Para a comparação entre os resultados dos dois testes calculou-se a concordância e o coeficiente kappa, calculado e interpretado de acordo com os critérios mencionados por PEREIRA (1995).

Essa comparação também foi realizada com base no teste de qui-quadrado de McNemar (JEKEL et al., 1999).

3- Resultados

Dos 1.459 soros bovinos analisados, 46 (3,15%) apresentaram resultado positivo na PAAT, enquanto os outros 1.413 (96,85%) apresentaram resultado negativo. Na prova de soroaglutinação em placa, 1.332 (91,30%) soros não apresentaram título, 70 (4,80%) apresentaram título 25, 26 (1,78%) apresentaram título 50, 8 (0,55%) apresentaram título 100, 8 (0,55%) apresentaram título 200 e 15 (1,03%) apresentaram título 400. Dos 1.413 soros negativos na PAAT, 1.329 (94,06%) não apresentaram título na prova de soroaglutinação em placa, 62 (4,39%) apresentaram título 25, 19 (1,34%) apresentaram título 50, 2 (0,14%) apresentaram título 100 e 1 (0,07%) apresentou título 200; nenhum deles apresentou título 400. Quanto aos 46 soros com resultado positivo na PAAT, 3 (6,52%) não apresentaram título na prova de soroaglutinação em placa, 8 (17,39%) apresentaram título 25, 7 (15,22%) apresentaram título 50, 6 (13,04%) apresentaram título 100, 7 (15,22%) apresentaram título 200 e 15 (32,61%) apresentaram título 400 (Tabela 1).

Adotando-se o título 25 como ponto de corte para a prova de soroaglutinação em placa, 127 (8,70%) dos 1.459 soros seriam positivos nessa prova, contra 46 (3,15%) positivos na PAAT, e 1.332 (91,30%) seriam negativos. Dos 46 soros positivos na PAAT, 43 (93,48%) seriam também positivos na prova de soroaglutinação em placa, enquanto 3 (6,52%) seriam negativos. Dos 1.413 soros negativos na PAAT, 84 (5,94%) seriam positivos na prova de soroaglutinação em placa, e 1.329 (94,06%) seriam negativos (Tabela 2).

Por esse critério, a concordância entre os dois testes foi 94,04%, e o indicador Kappa foi 0,31. A diferença entre as duas provas foi significativa ($p < 0,01$), pois o teste de qui-quadrado de McNemar revelou um valor de 73,56 ($p < 0,01$).

Caso se adotasse o título 50 como ponto de corte para a prova de soroaglutinação em placa, 57 (3,91%) dos 1.459 soros seriam positivos nessa prova, contra 46 (3,15%) na PAAT, e 1.402 (96,09%) seriam negativos. Dos 46 soros positivos na PAAT, 35 (76,09%) seriam também positivos na prova de soroaglutinação em placa, enquanto 11 (23,91%) seriam negativos. Dos 1.413 soros negativos na PAAT, 22 (1,56%) seriam positivos na prova de soroaglutinação em placa, e 1.391 (98,44%) seriam negativos (Tabela 3).

Nessa situação, a concordância entre os testes foi 97,74%, com um indicador kappa 0,71. Pelo teste de qui-quadrado de McNemar ($X^2 = 3,03$), a diferença entre os testes não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Resultados revelados pela prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e pela prova de soroaglutinação em placa (SAP) para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

PAAT	SAP						Total
	-	25	50	100	200	400	
Negativo	1.329	62	19	2	1	0	1.413
Positivo	3	8	7	6	7	15	46
Total	1.332	70	26	8	8	15	1.459

Tabela 2 - Comparação entre os resultados da prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e da prova de soroaglutinação em placa (SAP), adotando-se o título 25 como ponto de corte, para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

PAAT	SAP (≥ 25)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	43	3	46
Negativo	84	1.329	1.413
Total	127	1.332	1.459

$$\text{Concordância} = \frac{43 + 1.329}{1.459} = 94,04\%$$

$$\text{Kappa} = 0,31$$

$$X^2 \text{ de McNemar} = 73,56$$

Tabela 3 - Comparação entre os resultados da prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT) e da prova de soroaglutinação em placa (SAP), adotando-se o título 50 como ponto de corte, para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

PAAT	SAP (≥ 50)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	35	11	46
Negativo	22	1.391	1.413
Total	57	1.402	1.459

$$\text{Concordância} = \frac{35 + 1.391}{1.459} = 97,74\%$$

Kappa = 0,71
 χ^2 de McNemar = 3,03

4- Discussão

Os programas de combate à brucelose, baseados no esquema de teste e abate, por envolverem o exame de um número muito grande de amostras, exigem a disponibilidade de um teste de triagem, rápido, barato e que proporcione resultados confiáveis. Um teste com essa finalidade deve dar poucas reações falso-negativas, porque, se animais infectados são erroneamente considerados livres da infecção, pode haver a disseminação do agente etiológico em rebanhos tidos como livres da infecção. O teste de triagem deve também dar poucos resultados falso-positivos, pois em caso contrário muitos soros terão de ser submetidos aos teste confirmatórios, tornando o procedimento mais caro e mais demorado.

Essas características, de acordo com DAVIES (1971), são apresentadas pelo teste do antígeno acidificado tamponado, e por isso o mesmo vem sendo utilizado como teste de triagem em diversos países.

Os dados do presente trabalho mostram a ocorrência de resultados negativos na prova do antígeno acidificado tamponado em soros apresentando títulos altos na prova

de soroaglutinação em placa, assim como a ocorrência de resultados positivos na prova do antígeno acidificado tamponado em soros sem título ou com título baixo na prova de soroaglutinação (Tabela 1).

Considerando o título 25 como ponto de corte para a prova de soroaglutinação, constata-se uma concordância de 94,04% entre as duas provas, com um indicador kappa 0,31, que mostra uma concordância sofrível, e diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois testes (Tabela 2). Esses dados sugerem que o uso da prova de soroaglutinação em placa na diluição 1/25 como teste de triagem levaria à necessidade de submeter um número maior de soros aos testes confirmatórios, em comparação com a prova do antígeno acidificado. Esses resultados estão associados à ocorrência de reações não específicas na prova de soroaglutinação, conforme observaram ALLAN et al. (1976).

Na hipótese de adoção do título 50 como ponto de corte para a prova de soroaglutinação, a concordância sobe para 97,74%, e o indicador kappa 0,71 aponta para uma concordância boa, além da análise estatística indicar que a diferença entre os dois testes não foi significativa (Tabela 3). Apesar dessa maior concordância, a adoção desse ponto de corte no teste de triagem pela prova de soroaglutinação implicaria um risco aumentado de que animais infectados tivessem um diagnóstico negativo, uma vez que de 46 soros positivos na prova do antígeno acidificado 11 deram resultado negativo na prova de soroaglutinação. BRINLEY MORGAN et al. (1969) já haviam encontrado soros sem título na prova de soroaglutinação e resultado positivo no teste rosa de Bengala e, no outro extremo, soros com títulos altos na prova de soroaglutinação e resultado negativo no teste rosa de Bengala. Essa possibilidade de risco de resultado falso-negativo na prova de soroaglutinação está associada ao fato de essa prova freqüentemente proporcionar títulos baixos em animais infectados, conforme constataram ALTON et al. (1975), e em animais com títulos elevados na reação de fixação de complemento, conforme observou MATHIAS (1996).

Pelos resultados obtidos e pelos dados encontrados na literatura, pode-se concluir que a prova do antígeno acidificado é vantajosa em relação à prova de soroaglutinação em placa para uso como teste de triagem no diagnóstico sorológico da

brucelose bovina, por proporcionar resultados mais confiáveis, por ser de mais fácil execução e de mais fácil interpretação. Isso indica o acerto da nova legislação brasileira (BRASIL, 2001) ao adotar a prova do antígeno acidificado como teste de triagem, critério adotado por vários países desenvolvidos que conseguiram erradicar a brucelose ou reduzir drasticamente a taxa de prevalência.

5- Referências

ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P., McNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 287-298, 1976.

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

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; McPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation test, serum agglutination and rose bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 57-63, 1975

BEH, K.J. Distribution of *Brucella* antibody among immunoglobulin classes and low molecular weight antibody fraction in serum and whey of cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 14, p. 381-384, 1973.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 2001. Seção 1, p. 11-17.

BRINLEY MORGAN, W.J.; MACKINNON, D.J.; LAWSON, J.R., CULLEN, G.A. The rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. **Veterinary Record**, v. 85, p. 636-641, 1969.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina**. Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. 9 p. (Nota Técnica n. 2, rev. 1)

CORBEL, M.J. Identification of the immunoglobulin class active in the rose Bengal plate test for bovine brucellosis. **Journal of Hygiene**, v. 70, n. 4, p. 779-795, 1972.

CORBEL, M.J. Studies on the mechanism of the rose Bengal plate test for bovine brucellosis. **British Veterinary Journal**, v. 129, p. 157-166, 1973.

DAVIES, G. The rose Bengal test. **Veterinary Record**, v. 88, p. 447-449, 1971.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 328 p.

LEVIEUX, D. Immunoglobulines bovines et brucellose. I - Purification des immunoglobulines et préparation de leurs antisérums spécifiques. **Annales de Recherches Vétérinaires**, v. 5, n. 3, p. 329-342, 1974.

MATHIAS, L.A. Diagnóstico laboratorial da brucelose. In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO DO CONE SUL, I, 1996, Campo Grande. **Anais ...**Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 1996. p.139-140.

NICOLETTI, P. Utilization of the card test in brucellosis eradication. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 151, n. 12, p. 1.778-1.783, 1967.

O'REILLY, D.J.; CUNNINGHAM, B. An assessment of the brucellosis card test. **Veterinary Record**, v. 88, p. 590-594, 1971.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia. Teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596 p.

ROSE, J.E.; ROEPKE, M.H. An acidified antigen for detection of nonspecific reactions in the plate-agglutination test for bovine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 550-555, 1957.

CAPÍTULO 5 - COMPARAÇÃO ENTRE A REAÇÃO DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO E A PROVA DO MERCAPTOETANOL COMO TESTES CONFIRMATÓRIOS NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE BOVINA

RESUMO - O trabalho teve por objetivo comparar os resultados proporcionados pela reação de fixação de complemento com aqueles proporcionados pela prova do mercaptoetanol como testes confirmatórios no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. Foram examinados 129 soros com resultado positivo na prova do antígeno acidificado tamponado ou com título a partir de 25 na prova de soroaglutinação em placa, obtidos de rebanhos bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, SP. Para a comparação entre os resultados obtidos utilizou-se o indicador kappa, e a análise estatística baseou-se no teste de qui-quadrado de McNemar. Adotando como ponto de corte o título 4 para a fixação de complemento e o título 25 para a prova do mercaptoetanol, observou-se concordância de 89,92% entre os dois testes, considerada boa, pois o indicador kappa foi 0,78. No entanto, pela análise estatística, os resultados dos dois testes apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$). Pelos dados do presente trabalho pode-se concluir que a reação de fixação de complemento apresenta maior sensibilidade do que a prova do mercaptoetanol e que o uso desta pode acarretar a obtenção de resultados falso-negativos, pois foram observados soros com título variando de 8 a 64 na reação de fixação de complemento mas com resultado negativo na prova do mercaptoetanol. Apesar dessa possibilidade, deve-se considerar que a adoção do teste do mercaptoetanol pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose é um avanço em relação à situação anterior, em que o diagnóstico era baseado apenas na prova de soroaglutinação em placa.

Palavras-Chave: Concordância, indicador kappa

1- Introdução

Os programas de combate à brucelose animal baseiam-se no diagnóstico para a identificação dos animais infectados e posterior eliminação dos mesmos, de modo a reduzir o número de fontes de infecção circulando no rebanho.

Como esse esquema exige o teste de um grande número de animais, o procedimento adotado consiste no uso de um teste de triagem, mais simples e mais sensível, sendo posteriormente o resultado positivo confirmado por um teste mais específico, o qual é, geralmente, mais trabalhoso, não sendo, por isso, aplicado a todo o rebanho.

Entre as provas sorológicas usadas na confirmação do resultado positivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina destaca-se a reação de fixação de complemento, usada desde o início do século XX para esse propósito (JONES et al., 1963) e adotada pelo programa da maioria dos países que conseguiram erradicar a enfermidade.

A reação de fixação de complemento tem sido usada no diagnóstico da brucelose porque apresenta boa correlação com o isolamento do agente etiológico a partir de bovinos natural ou experimentalmente infectados (HAYES & CHAPPEL, 1982; SUTHERLAND et al., 1982; CORNER et al., 1983), e porque sofre menos influência de anticorpos resultantes da vacinação (ALTON et al., 1975). A forte associação da fixação do complemento com a infecção está relacionada com o fato de esse teste detectar principalmente IgG1 (CORBEL, 1972; ALLAN et al., 1976), principal imunoglobulina resultante da infecção por *B. abortus* em bovinos.

No entanto, a reação de fixação de complemento é uma técnica muito trabalhosa, que exige a utilização de reagentes recém-preparados, o que dificulta o seu uso. Além disso, há uma variação muito grande nas técnicas utilizadas, não havendo uma padronização internacional (ACHA & SZYFRES, 2001).

A prova do mercaptoetanol baseia-se na capacidade desse reagente de inativar as imunoglobulinas da classe IgM, sem interferir com aquelas da classe IgG, o que torna o teste mais específico. Trata-se de uma prova mais simples e que não exige

equipamentos especiais (GARCIA-CARRILLO, 1970), e trabalhos de pesquisa mostram sua eficácia como teste de diagnóstico da brucelose bovina. TOMÉ et al. (1987) obtiveram rápida diminuição na taxa de prevalência em um rebanho bovino na Argentina usando o teste do mercaptoetanol como método de diagnóstico.

Em decorrência das dificuldades na realização da fixação de complemento e da maior facilidade de execução da prova do mercaptoetanol, alguns programas preferem usar essa última como teste confirmatório, como é o caso do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, instituído em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001).

Entretanto, há divergências entre os trabalhos de pesquisa sobre a substituição da fixação de complemento pela prova do mercaptoetanol. NICOLETTI (1969) verificou não haver diferença significativa entre os dois testes quanto à capacidade de proporcionar resultado positivo em bovinos comprovadamente infectados, MARIÑO et al. (1991) observaram que a prova do mercaptoetanol apresentou resultados comparáveis aos apresentados pela reação de fixação de complemento para diagnosticar a infecção em bovinos naturalmente infectados, e MYLREA & FRASER (1976) constataram correspondência entre os resultados do mercaptoetanol e títulos a partir de 16 na reação de fixação de complemento; no entanto, CORRÊA DE SÁ (1989) concluiu que a prova de fixação de complemento não deve ser substituída pelo mercaptoetanol, apesar dessa última ser de mais fácil execução, pois não observou correspondência rigorosa entre os resultados dos dois testes.

Com o intuito de contribuir para o esclarecimento dessa questão, o presente trabalho teve por objetivo comparar os resultados proporcionados pela reação de fixação de complemento com aqueles proporcionados pela prova do mercaptoetanol para o diagnóstico da brucelose bovina em soros com reação na prova do antígeno acidificado tamponado ou na prova de soroaglutinação em placa.

2- Material e Métodos

2.1- Soros examinados

Foram examinados 129 soros bovinos com título igual ou superior a 25 na prova de soroaglutinação em placa (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1968) ou com resultado positivo na prova do antígeno acidificado tamponado (ALTON et al., 1988).

2.2- Testes sorológicos

Todos os soros foram submetidos à reação de fixação de complemento e ao teste do mercaptoetanol

2.2.1- Reação de fixação de complemento

Foi empregada microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988), cujos detalhes estão descritos no item 2.5.3 do Capítulo 2.

2.2.2- Prova do mercaptoetanol

Foi realizada conforme a metodologia recomendada por GARCIA-CARRILLO (1982).

Empregou-se antígeno de célula total, preparado com *Brucella abortus* amostra 1.119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração final de 0,045% de volume celular.

Utilizou-se como diluente solução salina 0,85%, com um concentração final de 0,714% de 2-mercaptoetanol.

Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com um volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno.

Fazia-se a leitura após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

Para a interpretação dos resultados, considerou-se como ponto de corte o título 25, adotado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2001).

2.3- Análise estatística

Para a comparação entre os resultados dos dois testes calculou-se a concordância e o coeficiente kappa, de acordo com os critérios mencionados por PEREIRA (1995).

Essa comparação também foi realizada com base no teste de qui-quadrado de McNemar (JEKEL et al., 1999).

3- Resultados

Dos soros examinados nos testes de triagem, 130 apresentaram algum título na prova de soroaglutinação em placa ou foram positivos na prova do antígeno acidificado, mas um deles apresentou atividade anticomplementar na reação de fixação de complemento, e, portanto, não foi possível obter o resultado por esse teste. Dos 129 soros testados nas duas provas confirmatórias, 79 (61,24%) não apresentaram título na reação de fixação de complemento, 2 (1,55%) apresentaram título 4, 8 (6,20%) apresentaram título 8, 6 (4,65%) apresentaram título 16, 9 (6,98%) apresentaram título 32, 4 (3,10%) apresentaram título 64, 9 (6,98%) apresentaram título 128 e 12 (9,30%) apresentaram título igual ou superior a 256 (Tabela 1).

Na prova do mercaptoetanol, 92 (71,32%) dos 129 soros não apresentaram título, 5 (3,88%) apresentaram título 25, 5 (3,88%) apresentaram título 50, 9 (6,98%)

apresentaram título 100, 8 (6,20%) apresentaram título 200, 4 (3,10%) apresentaram título 400 e 6 apresentaram título 800 (Tabela 1).

Adotando-se como ponto de corte o título 25 na prova do mercaptoetanol e o título 4 na reação de fixação de complemento, constata-se que 37 (28,68%) soros foram positivos e 92 (71,32%) negativos no primeiro, ao passo que 50 (38,76%) soros foram positivos e 79 (61,24%) negativos no segundo teste (Tabela 2).

Todos os soros positivos na prova do mercaptoetanol também foram positivos na fixação de complemento; dos 92 soros negativos no mercaptoetanol, 13 (14,13%) foram positivos na fixação de complemento e 79 (85,87%) foram negativos nesse teste. Dos 50 soros positivos na reação de fixação de complemento, 37 (74,00%) foram positivos também na prova do mercaptoetanol, e 13 (26,00%) foram negativos. Todos os 79 soros negativos na fixação de complemento também o foram no outro teste (Tabela 2).

Essas comparações resultam em uma concordância de 89,92% entre as duas provas, com um coeficiente kappa 0,78. A diferença entre esses resultados foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 11,08 ($p < 0,01$).

Tabela 1 - Títulos obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da prova do mercaptoetanol (ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

RFC	ME							Total
	-	25	50	100	200	400	800	
-	79	0	0	0	0	0	0	79
2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	1	0	0	0	2
8	6	2	0	0	0	0	0	8
16	3	1	1	1	0	0	0	6
32	3	1	2	2	1	0	0	9
64	1	0	0	2	1	0	0	4
128	0	0	1	3	4	1	0	9
256	0	0	1	0	2	3	6	12
Total	92	5	5	9	8	4	6	129

Tabela 2 - Interpretação dos títulos obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da prova do mercaptoetanol (ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos dos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo, 2000.

RFC (≥ 4)	ME (≥ 25)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	37	13	50
Negativo	0	79	79
Total	37	92	129

$$\text{Concordância} = \frac{37 + 79}{129} = 89,92\%$$

$$\text{Kappa} = 0,78$$

$$\chi^2 = 11,08$$

4- Discussão

Os dados do presente trabalho não mostram uma correspondência perfeita entre os resultados proporcionados pelos dois testes, o que está de acordo com as observações de CORRÊA DE SÁ (1989), pois 13 soros com título variando de 8 a 64 na fixação de complemento, considerados positivos, não apresentaram título na prova do mercaptoetanol (Tabela 1). Já o contrário não ocorreu, pois os 79 soros sem título na fixação de complemento também não apresentaram título na prova do mercaptoetanol.

Esses resultados sugerem maior sensibilidade da reação de fixação de complemento e a possibilidade de o teste do mercaptoetanol proporcionar resultado negativo em soro com título alto na fixação de complemento, o que pode ser tido com um resultado falso-negativo, em função da grande correlação entre a infecção por *Brucella* e os resultados da fixação de complemento, conforme observaram HAYES & CHAPPEL (1982), SUTHERLAND et al. (1982) e CORNER et al. (1983).

Adotando como ponto de corte o título 4 para a fixação de complemento e o título 25 para a prova do mercaptoetanol, observou-se concordância de 89,92%, considerada boa, pois o indicador kappa foi 0,78. No entanto os resultados dos dois testes apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$), diferindo das observações de

NICOLETTI (1969), que não encontraram diferença significativa entre as duas provas, e da observações de MARIÑO et al. (1991), que observaram resultados comparáveis entre os dois testes.

Mesmo que se adotasse o título 16 como ponto de corte da reação de fixação de complemento, como fizeram MYLREA & FRASER (1976), sete soros, com títulos de 16 a 64, teriam resultado negativo na prova do mercaptoetanol.

É preciso mencionar também que as diferenças entre os resultados obtidos nos diversos trabalhos podem estar associadas às diferenças de técnicas empregadas na reação de fixação de complemento, pois os critérios utilizados pelos diversos laboratórios diferem bastante (ACHA & SZYFRES, 2001).

Pelos dados do presente trabalho pode-se concluir que a reação de fixação de complemento apresenta maior sensibilidade do que a prova do mercaptoetanol e que o uso desta pode acarretar a obtenção de resultados falso-negativos. Apesar dessa possibilidade, deve-se considerar que o uso da prova do mercaptoetanol pode permitir redução na taxa de prevalência da infecção, conforme observaram TOMÉ et al. (1987), e que, portanto, sua adoção pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2001) é um avanço em relação à situação anterior, em que o diagnóstico era baseado apenas na prova de soroaglutinação em placa, e é uma medida acertada, levando-se em conta a maior facilidade de execução e a menor exigência de equipamentos, permitindo a realização da prova por um número maior de laboratórios. Uma vez obtida a redução nas taxas de prevalência, e com melhor treinamento e capacitação por parte dos laboratórios envolvidos, poderá ser feita a opção por um teste confirmatório mais sensível.

5- Referências

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. v. 1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.

ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; McNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, v. 76, n.2, p. 287-298, 1976.

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

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; McPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose Bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 57-63, 1975.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 2001. Secção 1, p. 11-17.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina**. Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. 9 p. (Nota Técnica n. 2, rev. 1)

CORBEL, M.J. Identification of the immunoglobulin class active in the rose Bengal plate test for bovine brucellosis. **Journal of Hygiene**, v. 70, n.4, p. 779-795, 1972.

CORNER, L.A.; ALTON, G.G.; McNICHOL, L.N.; STREETENS, T.; TRUEMAN, K.F. An evaluation of an anamnestic test for brucellosis in cattle of the northern pastoral areas. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 1, p. 1-3, 1983.

CORRÊA DE SÁ, M.I.V.C. Avaliação da prova de imunodifusão radial com o antigénio hapteno nativo (HN) no diagnóstico serológico da brucelose em animais infectados e vacinados. Estudo comparativo com outras provas serológicas. **Repositório de Trabalhos do L.N.I.V.**, v. 21, p. 11-44, 1989.

GARCIA-CARRILLO, C. Métodos para el diagnóstico de la brucelosis. **Gaceta Veterinaria**, v. 32, n. 246, p. 661-667, 1970.

GARCIA-CARRILLO, C. **Pruebas suplementarias para el diagnostico de la brucelosis**. Ramos Mejia: Centro Panamericano de Zoonosis, 1982. 30 p. (Nota Técnica n. 25)

HAYES, J.; CHAPPEL, R.J. A comparison of the results of the brucellosis radioimmunoassay and other serological tests in experimentally infected cattle. **Journal of Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 21-28, 1982.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 328 p.

JONES, L.M.; HENDRICKS, J.B.; BERMAN, D.T. The standardization and use of complement-fixation test for the diagnosis of bovine brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 24, p. 1.143-1.151, 1963.

MARIÑO J., O.C.; GALLEGOS M., M.I.; DELEÓN, L.S.; ALMANSA M., J. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. In: FRANK, J.F. ed. **Networking in brucellosis research**. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network. Tokyo: United Nations University Press, 1991. p. 120-130.

MYLREA, P.J.; FRASER, G.C. The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 261-266, 1976.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 10, p. 1.811-1.816, 1969.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia. Teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 596 p.

SUTHERLAND, S.S.; LE GRAS, D.V.; ROBERTSON, A.G.; JOHNSTON, J.M.; EVANS, R.J. Serological response of cattle after vaccination and challenge with *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 165-175, 1982.

TOMÉ, J.S.G.; DEL PALACIO RODRÍGUEZ, E.; SAMARTINO, L.E. Brucelosis bovina: eliminación de reaccionantes al 2-mercaptoetanol y rápida disminución de la prevalencia brucelica en un rodeo de cría altamente infectado. **Veterinaria Argentina**, v. 9, n. 31, p. 71-81, 1987.

CAPÍTULO 6 - IMPLICAÇÕES

Após longo tempo de convivência com a brucelose bovina, inquestionáveis avanços no conhecimento sobre a mesma propiciaram ferramentas que permitem seu controle e até mesmo sua erradicação, como provam os bem-sucedidos programas adotados em diversos países que conseguiram erradicar a enfermidade, entre os quais podem ser citados: Suécia, Finlândia, Dinamarca, Suíça, Alemanha, Irlanda, Noruega, Reino Unido, Canadá, Austrália e Nova Zelândia, entre outros (CORBEL, 1997). Há também países, como é o caso dos Estados Unidos, que já conseguiram erradicar a enfermidade na maior parte do território, estando muito próximos da erradicação total.

O exame dessa relação mostra que, não por acaso, dela fazem parte países desenvolvidos, ricos e industrializados, o que indica que há disponibilidade de recursos científicos que permitem enfrentar com sucesso esse problema, mas há necessidade também de investimento e de atuação do poder público para que esse sucesso seja alcançado.

Paralelamente a essa redução na área de ocorrência da brucelose bovina, o aprofundamento do conhecimento científico mostra que a disseminação das bactérias do gênero *Brucella* é mais ampla do que anteriormente imaginado, como comprovam vários relatos - a partir dos trabalhos pioneiros de EWALT et al. (1994) e ROSS et al. (1994) - de isolamento de um microrganismo desse gênero a partir de mamíferos marinhos, para o qual JAHANS et al. (1997) propuseram o nome *B. maris*. Comprovando a associação entre essas situações, RHYAN et al. (2001) inocularam *Brucella* isolada de mamíferos marinhos em seis vacas prenhes e observaram soroconversão em todas e abortamento em duas, das quais o microrganismo foi reisolado. Esses achados exemplificam bem a complexidade do problema e o quanto ainda pode haver por ser descoberto, fato que, certamente, não é exclusividade deste ramo da pesquisa científica.

Os resultados do presente trabalho indicam que a taxa de prevalência da brucelose bovina na região estudada, e que eventualmente pode servir de exemplo para outras áreas com as mesmas características, parece não ser tão elevada quanto se

poderia supor. Anos de combate ao problema por ação isolada de parte dos proprietários e por ações esparsas do poder público devem ter resultado em uma redução na porcentagem de animais infectados, o que pode levar alguns a encarar a brucelose bovina como um problema não prioritário, a não merecer o esforço de um programa de controle. É preciso enfatizar que tal posição seria um erro, por diversos motivos: essa taxa de prevalência, principalmente quando aplicada a um rebanho da dimensão do brasileiro, acarreta volume significativo de perdas econômicas; a enfermidade é uma zoonose, atingindo o ser humano, mormente aqueles mais expostos ao contato direto com o animal infectado; a adoção de medidas rígidas é mais justificável quando a prevalência não é tão alta, pois os custos de tais medidas são menores, e as possibilidades de erradicação se apresentam mais palpáveis.

Além dos aspectos mencionados, merecem destaque especial dois outros detalhes apontados pelos resultados da pesquisa: a porcentagem de rebanhos com animais infectados e a diferença de situação entre os diversos rebanhos.

Embora a proporção de animais reagentes tenha sido 3,43%, em 16,67% dos rebanhos havia animais reagentes. Tal porcentagem não parece tão baixa e aponta para a necessidade de algum tipo de ação, que, pelo menos no caso dos produtores de menor poder aquisitivo, deve contar com a ajuda do Estado, pois, para eles, arcar com os custos da erradicação da enfermidade representa um peso maior.

Os resultados do trabalho mostram também uma diferença grande de situação entre os diversos rebanhos examinados. Enquanto muitos rebanhos estavam livres da enfermidade, houve rebanho em que até metade dos animais que compuseram a amostra estavam infectados. Essa diferença de condição reflete com clareza o resultado de uma política sanitária na qual as principais atividades dependem da ação isolada do produtor e na qual há pouca participação do Estado. Nunca é demais lembrar que, embora seja o produtor o principal interessado, há obviamente o interesse maior da sociedade, pois a menor ocorrência da enfermidade animal resulta na menor ocorrência da enfermidade humana e na maior facilidade para a conquista de mercados, com todas as vantagens que disso advêm, o que justifica o investimento estatal para atacar o problema.

Como se poderia supor, a introdução de animais no rebanho sem a comprovação de que estejam livres de brucelose representa um risco muito grande de introdução da enfermidade em um rebanho até então considerado livre. Essa constatação realça a importância da orientação aos produtores para que, mesmo diante de um bom negócio, não deixem de lado o indispensável rigor quanto às medidas sanitárias.

Pela avaliação dos testes sorológicos pode-se deduzir que a adoção da prova do antígeno acidificado tamponado como teste de triagem e da prova do mercaptoetanol como teste confirmatório, por parte do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, prevista inicialmente para entrar em vigor em junho de 2002 e posteriormente adiada para dezembro de 2003, é uma medida acertada porque representa um avanço em relação ao que previa a legislação anterior, ou seja, o diagnóstico sorológico da brucelose baseado apenas na prova de soroaglutinação em placa, a qual pode apresentar problema tanto de falta de sensibilidade quanto de falta de especificidade. É de se esperar, portanto, que os novos critérios venham a contribuir para a obtenção de um diagnóstico mais confiável e útil para o momento, podendo, no futuro, o programa sofrer as correções que se mostrarem necessárias.

Concluindo, a taxa de prevalência não muito elevada e a disposição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de enfrentar o problema, demonstrada pela implantação do novo programa, são aspectos auspiciosos a apontar para a possibilidade de, no futuro próximo, a situação sanitária do rebanho brasileiro, no que tange à brucelose bovina, ser melhor do que é hoje, votos que devem ser estendidos às enfermidades de outras espécies, entre as quais, e principalmente, as enfermidades humanas.

Referências

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses, Jerusalem, Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; CUMMINS, D.R.; MILLER, W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 448-452, 1994.

JAHANS, K.L.; FOSTER, G.; BROUGHTON, E.S. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. **Veterinary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 373-382, 1997.

RHYAN, J.C.; GIDLEWSKI, T.; EWALT, D.R.; HENNAGER, S.G.; LAMBOURNE, D.M.; OLSEN, S.C. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 5, p. 379-382, 2001.

ROSS, H.M.; FOSTER, G.; REID, R.J.; JAHANS, K.L.; MACMILLAN, A.P. *Brucella* species infection in sea-mammals. **Veterinary Record**, v. 134, n. 14, p. 359, 1994.

Anexo 1 - Informações obtidas para a análise de fatores associados à prevalência da brucelose bovina nos municípios de Altinópolis e Santo Antonio da Alegria, Estado de São Paulo.

INFORMAÇÕES RELATIVAS À PROPRIEDADE

Nome: _____ Município: _____
Distrito _____ Setor: _____
Área: _____ Exploração principal: _____
Dispõe de orientação técnica:
() Não () Sim
() Veterinário () Agrônomo () Zootecnista () Técnico Agrícola
() Cooperativa () Casa da Agricultura
Uso de mão-de-obra - Familiar () Nº de pessoas envolvidas: _____
Empregados fixos: _____
Empregados temporários: _____

INFORMAÇÕES RELATIVAS AO PROPRIETÁRIO

Nome: _____ Nascimento: ____/____/____
Endereço: Rua/Av.: _____ Nº: _____
Bairro: _____
Cidade: _____ Estado: _____
CEP: _____
Caixa Postal: _____
Telefone: _____
Grau de instrução: _____ Formação: _____
Mora na propriedade: _____
É o responsável pelo manejo: _____

INFORMAÇÕES RELATIVAS AO REBANHO

Número total de animais:

Tipo de exploração: () corte () leite () mista

Raça predominante:

Usa apenas monta natural:

Usa apenas Inseminação artificial:

Usa monta natural apenas quando a inseminação falha:

Usa ambas, em função de outros fatores:

Transferência de embriões:

Ordenha mecânica:

Número de ordenhas:

Número de vacas em lactação:

Produção média diária de leite: Tipo de leite: A B C Outro:

Área da propriedade utilizada para pasto:

Tipo de pastagem:

Sistema de criação: () confinado () semiconfinado () extensivo

Alimentação: () pasto () volumoso no cocho () concentrado () outros

Fonte de água para os animais: () poço () mina () rio/córrego () outro

O rio ou córrego passa antes em outra propriedade que cria bovinos:

Há vizinhos que criam bovinos: Quantos vizinhos:

Há informações sobre ocorrência de brucelose nos vizinhos

Usa piquete maternidade:

Compra animais: Fonte de reposição:

Compra animais em leilão:

Cria outras espécies animais na mesma propriedade:

Quais:

Os bovinos têm contato com esses animais:

Faz vacinação contra brucelose: Há quanto tempo:

Exige exame negativo de brucelose antes de comprar os animais:

Já fez exame de brucelose no rebanho bovino:

Houve animais reagentes:

Os reagentes foram descartados:

Outras providências adotadas:

Faz regularmente exame para brucelose:

Frequência:

Providências adotadas em função do exame:

Outras informações úteis:

INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS EXAMINADOS

Identificação do animal

Sexo

Idade

Raça

Vacinação contra brucelose

Ocorrência de problemas reprodutivos: aborto, natimorto, retenção de placenta,
infertilidade, repetição de cio, orquite etc.