



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS NO
DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA EM AMOSTRAS
PROVENIENTES DE UM FRIGORÍFICO E DE UM
REBANHO NATURALMENTE INFECTADO DO ESTADO
DE SÃO PAULO.**

Raphaella Barbosa Meirelles-Bartoli

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

2010

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

**AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS NO
DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA EM AMOSTRAS
PROVENIENTES DE UM FRIGORÍFICO E DE UM
REBANHO NATURALMENTE INFECTADO DO ESTADO
DE SÃO PAULO.**

Raphaella Barbosa Meirelles-Bartoli

Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Julho – 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAPHAELLA BARBOSA MEIRELLES-BARTOLI – nascida em São José do Rio Preto – SP, em 18 de abril de 1981, é Médica Veterinária formada pelo Centro Universitário de Rio Preto – Unirp, situado na cidade de São José do Rio Preto – SP, em dezembro de 2004. Na graduação, de março de 2003 a fevereiro de 2004, foi bolsista de iniciação científica pela Fapesp. Durante o primeiro ano de formada, de março 2005 a fevereiro de 2006, obteve uma bolsa de treinamento técnico nível III da Fapesp, com as atividades realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Iniciou o curso de pós-graduação em março de 2006, no qual contou com o apoio da Fapesp com bolsa de mestrado, e obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal em fevereiro de 2008. Em março de 2008, ingressou no curso de doutorado na mesma instituição do mestrado e obteve o título de Doutora em Medicina Veterinária Preventiva, em julho de 2010.

Exerce, desde setembro de 2007, a função de professora nas disciplinas de “Epidemiologia Veterinária”, “Doenças Infecciosas”, “Zoonoses & Saúde Pública”, “Defesa Sanitária Animal” e “Saneamento Ambiental” no Centro Universitário de Rio Preto – Unirp, contratada após aprovação em concurso”. Em 2008, criou o Grupo de Estudo em Saúde Pública Veterinária (GESP), exercendo a função de coordenadora, promovendo reuniões e trabalhos sociais com os alunos do curso de Medicina Veterinária da Unirp.

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes e não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olho adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendermos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa ou nada, e terem bons momentos juntos. Descobre que as pessoas com que você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso que sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e ambientes têm influência sobre nós, mas, nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.

Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fazem o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai, é uma das poucas que o ajudaram a levantar-se.

Aprende que a maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando se está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não te ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ame, contudo, o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que perdoar a si mesmo. Aprende que a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não para, para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.

O Menestrel - William Shakespeare

*Dedico esta vitória à minha maior saudade, minha querida avó materna, **Elídia Tabarine Barbosa** (in memoriam), por seu amor incondicional e tantos momentos felizes.*

Vó Lídia, amo muito você!

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, **Oswaldo Meirelles de Oliveira Filho**, e à minha mãe, **Edna Barbosa Meirelles**, pelo amor, pela compreensão, e principalmente por terem se privado de muitos prazeres da vida para me proporcionar uma das maiores heranças que se pode deixar a um filho: cultura e educação. Obrigada, do fundo do meu coração!

Ao meu irmão, **Oswaldo Meirelles de Oliveira Neto**, de quem tanto sinto saudades...

Ao meu avô materno, **Pedro Valêncio Barbosa**, pelo constante incentivo em minha carreira profissional. Obrigada, Vô Pedro!

À minha avó paterna, **Maria Vicente Oliveira**, pelas orações frente a cada obstáculo que tive. Obrigada, Vó Maria!

Ao meu avô paterno, **Oswaldo Meirelles de Oliveira** (*in memoriam*), que, apesar de poucos anos de convivência, também deve estar muito feliz por mim, onde quer que esteja.

Aos meus pais mexicanos, **Arturo** e **Estela** Saavedra Valdez; e aos meus irmãos mexicanos, **Cláudia**, **Asharia**, **Mário** e **Yasel**; muito obrigada pelo amor de vocês. Vocês fazem parte do meu sucesso profissional e da minha vida! Los quiero mucho y los extraño demasiado!

A minha sogra, **Leonice Bartoli**, e ao meu cunhado-irmão, **Danilo Bartoli de Sousa**, pelo amor, pelo apoio, pela alegria, mas principalmente pelas pessoas iluminadas que vocês são.

A toda minha família e amigos que torceram e acreditaram em mim!

A meus amigos sempre fiéis, **Mylla**, **Brutus**, **Byron** e **Marvin**, que me faziam companhia nas madrugadas adentro.

*E finalmente dedico esta conquista ao meu esposo **Daniel Bartoli de Sousa**. Obrigada por me incentivar nas dificuldades, por me orientar nas indecisões, por me ajudar a enxergar mais alto, por me instruir no verdadeiro amor. Você é um presente de Deus pra mim. Te amo!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. Luis Antonio Mathias**, mais que um professor, um cientista, epidemiologista, gramático da língua portuguesa, conhecedor de outros idiomas, músico, educador... Em resumo, um polímata, pela multiplicidade de talentos. Esteve sempre pronto para me auxiliar em todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho, mesmo com tantas outras atribuições. Seus conhecimentos e conselhos, me ajudaram a ser a profissional que sou e que almejo me tornar um dia. Agradeço imensamente os anos de convívio.

Aos meus professores da pós-graduação: **Ângela**, por seu carinho e sua confiança; **Adolorata**, por sua espontaneidade e amizade; **Amaral**, por sua serenidade e sabedoria; **Samir**, por sua experiência e animação; **Adjair**, por sua descontração e alegria; **Duri**, por sua sensatez e imparcialidade; **Glorinha** por sua simpatia e dedicação profissional. Qualidades de mestres, ensinamentos que jamais serão esquecidos!

Ao técnico do laboratório de diagnóstico de brucelose, **Nivaldo Aparecido Assis**, obrigada por tudo que me ensinou dentro de um laboratório, mas obrigada principalmente pelo modelo de ser humano que você é.

A todos os **funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Unesp de Jaboticabal-SP, obrigada pelo agradável convívio.

À minhas amigas **Fernanda Senter Magajevski**, **Poliana de Castro Melo**, **Michelle Brich**, **Fernanda de Rezende Pinto** obrigada pela amizade, pelo companheirismo, e pela força em todos os momentos que tanto precisei.

Aos meus amigos de laboratório **Felipe Jorge Silva**, **Talita Ribeiro Silva**, **Gian Riccardo Ortunho Galli** pelos momentos de descontração compartilhados e pela ajuda na reta final desse trabalho.

À minha eterna amiga **Neide Suely Palmejane Belotto**, que nunca me deixa esquecer o tamanho de minha capacidade. Obrigada por acreditar em mim.

Ao professor **Alan Peres Ferraz de Melo**, amigo, chefe, pessoa por quem tenho um imenso carinho e admiração, pelo apoio para meu cumprimento dos créditos do doutorado.

Aos amigos e chefes **Halim Atique Neto** e **Tábata Salum Calili Atique**, pelo incentivo constante e por estimular os professores da UNIRP à pós-graduação.

À técnica do laboratório de reprodução animal do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, **Ângela Maria Dias**, obrigada por cuidar de meus orientados na minha ausência.

À minhas alunas **Carolina de Alvarenga Cruz**, **Fernanda Cassioli de Moraes**, **Elisa Batistella Chrispim**, **Ana Carolina de Menezes**, **Dalila de Souza Silva** e **Thalita Masoti Blankenheim**, orientadas de iniciação científica e de monografia de 5º ano, mas acima de tudo amigas que tiveram uma importância muito grande na conclusão deste trabalho. Obrigada Piraputangas!

Aos meus orientados de iniciação científica **Diogo Fernando Bossini**, **Leonardo Henrique Scalão Queiroz** e **Sebastião Garcia Neto**, obrigada pela ajuda nas inúmeras colheitas no frigorífico.

Ao veterinário **Roberto Amâncio** e a todos os **funcionários** da granja obrigada pela colaboração e ajuda na colheita do sangue dos suínos.

Agradeço à **Azael E. Pizzolato Junior**, pela confiança e pelo apoio para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.2 REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 – RELATO DE UM FOCO DE BRUCELOSE SUÍNA OCORRIDO EM JABOTICABAL, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL....	14
RESUMO.....	14
SUMMARY.....	15
2.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.2 OBJETIVOS.....	18
2.2.1 Objetivo geral.....	18
2.2.2 Objetivos específicos.....	18
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.3.1 Características da propriedade.....	19
2.3.2 Obtenção das amostras.....	20
2.3.3 Técnicas laboratoriais.....	22
2.3.3.1 Teste do antígeno acidificado tamponado.....	22
2.3.3.2 Teste do 2-mercaptoetanol.....	23
2.3.3.3 Teste de soroaglutinação lenta.....	23
2.3.3.4 Reação de fixação de complemento.....	24
2.3.3.5 Cultivo, Isolamento e Identificação bacteriológica.....	25
2.4 RESULTADOS.....	26
2.5 DISCUSSÃO.....	33
2.6 CONCLUSÕES.....	38
2.7 REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE SUÍNA EM ANIMAIS ABATIDOS E TRABALHADORES EM UM FRIGORÍFICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	42
RESUMO.....	42
SUMMARY.....	43
3.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	44
3.2 OBJETIVOS.....	46
3.2.1 Objetivo geral.....	46
3.2.2 Objetivos específicos.....	46
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47

3.3.1	Características do frigorífico.....	47
3.3.2	Obtenção das amostras.....	48
3.3.3	Técnicas laboratoriais.....	48
3.3.3.1	Teste do antígeno acidificado tamponado.....	48
3.3.3.2	Teste do 2-mercaptoetanol.....	49
3.3.3.3	Teste de soroaglutinação lenta.....	49
3.3.3.4	Reação de fixação de complemento.....	49
3.4	RESULTADOS.....	50
3.5	DISCUSSÃO.....	52
3.6	CONCLUSÕES.....	55
3.7	REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO 4 – COMPARAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA.....		59
RESUMO.....		59
SUMMARY.....		60
4.1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	61
4.2	OBJETIVOS.....	72
4.2.1	Objetivo geral.....	72
4.2.2	Objetivos específicos.....	72
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.3.1	Obtenção das amostras.....	73
4.3.2	Técnicas laboratoriais.....	73
4.3.2.1	Teste do antígeno acidificado tamponado.....	73
4.3.2.2	Teste do 2-mercaptoetanol.....	74
4.3.2.3	Teste de soroaglutinação lenta.....	74
4.3.2.4	Reação de fixação de complemento.....	74
4.3.2.5	Teste da polarização fluorescente.....	74
4.3.2.6	Teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol	76
4.3.3	Análise dos dados	76
4.4	RESULTADOS.....	78
4.5	DISCUSSÃO.....	114
4.6	CONCLUSÕES.....	125
4.7	REFERÊNCIAS.....	127

APÊNDICES	135
------------------	------------

Apêndice 1. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	135
---	-----

Apêndice 2. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	135
Apêndice 3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	136
Apêndice 4. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	136
Apêndice 5. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	137
Apêndice 6. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	137
Apêndice 7. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	138
Apêndice 8. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	138

Apêndice 9. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	139
Apêndice 10. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	139
Apêndice 11. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	140
Apêndice 12. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	140
Apêndice 13. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	141
Apêndice 14. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	141

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – RELATO DE UM FOCO DE BRUCELOSE SUÍNA OCORRIDO EM JABOTICABAL, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL...	14
Figura 1 - Localização do município onde ocorreu o foco de brucelose suína, em 2006. Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil....	19
Figura 2 - Etapas da criação na propriedade do surto. Instalação das matrizes suínas infectadas (Foto A), maternidade (Foto B), creche (Foto C) e terminação (Foto D). Jaboticabal, 2006.....	20
Figura 3 - Colheita de sangue dos animais da fazenda. Matrizes (Foto A), animais da terminação (Foto B), bovinos (Foto C), ovinos (Foto D), equinos (Foto E), cães (Foto F) e gansos (Foto G). Jaboticabal, 2006.....	21
Figura 4 - Sinais clínicos apresentados por algumas das matrizes suínas naturalmente infectadas por <i>Brucella suis</i> . Fetos abortados (Foto A). Descarga vaginal (Foto B). Paralisia de membros posteriores (Foto C, Foto D e Foto E). Jaboticabal, 2006.....	26
Figura 5 - Achados anatomopatológicos apresentados pelas matrizes suínas naturalmente infectadas por <i>Brucella suis</i> necropsiadas na fazenda. Abscessos esplênicos (Foto A). Aderências no intestino delgado (Foto B). Jaboticabal, 2006.	27
Figura 6 - Cães na instalação das matrizes suínas naturalmente infectadas (Foto A e B). Jaboticabal, 2006.....	30
CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE SUÍNA EM ANIMAIS ABATIDOS E TRABALHADORES EM UM FRIGORÍFICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	42
Figura 1 - Instalações para abate dos suínos em um frigorífico no Estado de São Paulo (2008-2010). Recepção (A). Corredor para as instalações internas do frigorífico (B). Dessensibilização por eletrochoque (C). Suspensão da carcaça (D). Carcaça em direção ao corredor da sangria (E). Colheita de sangue (F). Seção de sangria (G). Linha de abate após sangria (H).....	47

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 4 – COMPARAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA.....	59
Quadro 1 - Interpretação de Kappa, segundo PEREIRA (2000), adaptado de Landis & Kock (1977).....	77

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – RELATO DE UM FOCO DE BRUCELOSE SUÍNA OCORRIDO EM JABOTICABAL, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL...	14
Tabela 1 - Resultados dos testes de identificação de <i>Brucella suis</i> biovar 1 de amostras de fetos suínos abortados e das matrizes suínas naturalmente infectadas. Jaboticabal, 2006.	28
Tabela 2 - Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo das matrizes no diagnóstico da brucelose suína. Jaboticabal, 2006.....	29
Tabela 3 - Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo dos animais da terminação no diagnóstico da brucelose suína. Jaboticabal, 2006.....	29
Tabela 4 - Trabalhadores da granja de suínos, de acordo com sexo, idade, tipo de contato com os fetos abortados das matrizes naturalmente infectadas, resultado do teste de aglutinação no diagnóstico de brucelose suína e manifestação de sinais clínicos. Jaboticabal, 2006.....	31
 CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE SUÍNA EM ANIMAIS ABATIDOS E TRABALHADORES EM UM FRIGORÍFICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.....	 42
Tabela 1 - Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo de suínos colhidas em um frigorífico no Estado de São Paulo, 2008-2010.....	50

Tabela 2 -	Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo colhidas de funcionários de um frigorífico no Estado de São Paulo, 2010.....	50
Tabela 3 -	Trabalhadores do frigorífico do Estado de São Paulo, Brasil (2010), de acordo com sexo, tipo de atividade e resultado da sorologia para diagnóstico de brucelose suína.....	51
CAPÍTULO 4 – COMPARAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA.....		60
Tabela 1 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	78
Tabela 2 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	79
Tabela 3 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	80
Tabela 4 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	81
Tabela 5 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	81

Tabela 6 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	82
Tabela 7 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	83
Tabela 8 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	84
Tabela 9 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	84
Tabela 10 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	85
Tabela 11 -	Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	86
Tabela 12 -	Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	87

Tabela 13 - Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	87
Tabela 14 - Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	89
Tabela 15 - Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	89
Tabela 16 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	91
Tabela 17 - Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	91
Tabela 18 - Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	93
Tabela 19 - Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	93

Tabela 20 -	Valores de sensibilidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), considerando infectadas todas as matrizes da granja.....	94
Tabela 21 -	Valores de sensibilidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), considerando infectados os suínos da granja (matrizes e da terminação) com resultado positivo em pelo menos um dos testes oficialmente adotados no Brasil.....	95
Tabela 22 -	Valores de especificidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF) considerando não infectados todos os suínos do frigorífico e negativas as amostras suspeitas no TPF.....	96
Tabela 23 -	Valores de especificidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF) considerando como não infectados todos os suínos do frigorífico e desconsiderando as amostras suspeitas no TPF.....	96

Tabela 24 - Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.	97
Tabela 25 - Resultados da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.	98
Tabela 26 - Resultados do teste de reação de fixação de complemento (RFC) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e da polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.	99
Tabela 27 - Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	101

Tabela 28 - Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	102
Tabela 29 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	104
Tabela 30 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	105
Tabela 31 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	106

Tabela 32 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	107
Tabela 33 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e da reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	109
Tabela 34 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	110
Tabela 35 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	111

Tabela 36 - Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.....	112
Tabela 37 - Sensibilidade (S), especificidade (E) e soma de ambas (S+E) obtidas, de acordo com o ponto de corte (PC), para o teste de polarização fluorescente, para o diagnóstico sorológico da brucelose suína, usando a combinação do teste do antígeno acidificado, teste do mercaptoetanol e reação de fixação de complemento para estabelecer a condição verdadeira.....	113

AVALIAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE UM FRIGORÍFICO E DE UM REBANHO NATURALMENTE INFECTADO DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos epidemiológicos da brucelose suína, estudando a disseminação da enfermidade num surto detectado em julho de 2006, em um rebanho em Jaboticabal, no Estado de São Paulo, Brasil. De 271 matrizes examinadas, 254 (93,7%) foram positivas na reação de fixação de complemento (RFC), e de 62 animais da terminação testados, 17 (27,4%) foram positivos na mesma prova. Todos os 33 bovinos, 5 equinos, 126 ovinos e 25 gansos foram negativos no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), porém 3 (23,07%) dos 13 cães da propriedade foram positivos na RFC. Foram colhidas amostras de sangue dos 14 trabalhadores da granja; 3 (21,42%) deles apresentaram títulos de anticorpos contra brucelas lisas na prova de soroaglutinação em tubos, e apenas 1 (7,14%) apresentou sinais clínicos da doença. O biovar 1 de *Brucella suis* foi cultivado a partir de 14 fetos abortados e de 6 matrizes necropsiadas, e a identificação foi confirmada por provas de rotina. Não foram encontrados anticorpos específicos contra amostras lisas de *Brucella* em 1.100 amostras sanguíneas de suínos e em 24 de funcionários de um frigorífico do Estado de São Paulo. Foi avaliado o desempenho de 6 técnicas sorológicas, AAT, 2-mercaptoetanol realizado simultaneamente à soroaglutinação lenta (SAL+ME), RFC, antígeno acidificado tamponado após tratamento com rivanol (AAT-RIV), e teste de polarização fluorescente (TPF) no diagnóstico da brucelose suína a partir do soro sanguíneo colhidos de 333 suínos da fazenda do foco e de mais 1.100 animais abatidos no frigorífico. As informações relatadas neste trabalho indicaram que, apesar da redução da incidência da brucelose suína no Brasil, ainda ocorre infecção por *B.suis*, sendo um risco para a saúde animal e a saúde pública.

Palavras-chave: Brucelose, frigorífico, testes sorológicos, suínos, zoonoses

EVALUATION OF SEROLOGICAL TESTS IN THE DIAGNOSIS OF SWINE BRUCELLOSIS IN SERUM SAMPLES FROM AN SLAUGHTERHOUSE AND FROM A HERD NATURALLY INFECTED IN THE STATE OF SÃO PAULO

SUMMARY – The purpose of this study was to analyze epidemiological aspects of swine brucellosis, studying an outbreak in a herd in Jaboticabal, State of São Paulo, Brazil, detected in July 2006. Of 271 sows, 254 (93.7%) tested positive by the complement fixation test (CFT), and among 62 randomly bled fattening animals, 17 (27.4%) tested positive. All the 33 cattle, 5 horses, 126 sheep and 25 geese tested negative by the rose Bengal test (RBPT), however, 3 of the 13 dogs in the farm tested positive by the CFT. Blood samples were taken from 14 farm workers; 3 (21.42%) of them had antibody titers to smooth *Brucella* by the slow agglutination test, and 1 (7.14%) presented clinical signs. *B.suis* biovar 1 was cultured from 14 aborted fetuses and 6 sows. *Brucella* identification was accomplished by routine methods. Blood samples were taken from 1,100 pigs and 24 abattoir workers in a slaughterhouse in the state of São Paulo; all the animal and human sera tested negative to smooth *Brucella* antibodies. The performance of 6 serological tests were evaluated, RBPT, standart tube agglutination test plus mercaptoethanol test (STAT+2-ME), CFT, rose Bengal plate test after serum treatment with rivanol (RBPT-RIV), and fluorescence polarization assay (FPA), for the diagnosis of swine brucellosis in serum samples of 333 pigs from the outbreak and 1,100 pigs from the slaughterhouse. The results showed that, in spite of the reduction of swine brucellosis prevalence in Brazil, *B.suis* infection still occurs, posing a risk to animal and human health.

Key Words: Brucellosis, slaughterhouse, serological tests, swines, zoonosis

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é uma doença infectocontagiosa, de evolução crônica e de caráter granulomatoso típico, que acomete principalmente o sistema reprodutivo e o osteoarticular de bovinos, suínos, ovinos, caprinos, caninos, equinos e humanos (BATHKE, 1999).

É uma antroponose conhecida desde épocas remotas, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella* (PAULIN & FERREIRA, 2003). Há registros de que Hipócrates, em 460 a.C., fazia referência a pacientes com sintomas compatíveis com brucelose. Pesquisas recentes, realizadas na Itália, revelaram que esqueletos remanescentes de pessoas que sucumbiram à catástrofe do vulcão Vesúvio, na cidade de Herculano, ocorrida no ano 79 da era cristã, apresentavam lesões ósseas típicas de brucelose. Uma provável explicação para esse fato foi proporcionada pela microscopia eletrônica, que revelou a presença de cocobacilos compatíveis com *Brucella* em queijos elaborados com leite de cabras e que foram encontrados carbonizados em escavações naquela cidade italiana (CAPASSO, 2002).

A *Brucella* é um cocobacilo Gram-negativo que mede de 0,4 a 0,8 μm de diâmetro por 0,6 a 3,0 μm de comprimento (DEYOE, 1986). O organismo não tem motilidade e não forma esporos (ALTON, 1990).

As brucelas, quando cultivadas em meios sólidos, apresentam duas possíveis morfologias de colônias, lisas ou rugosas, decorrentes da constituição química da parede celular. Além de determinar a morfologia colonial, a composição química das paredes celulares das brucelas é elemento central nos fenômenos imunológicos. As espécies lisas possuem uma membrana citoplasmática interna, um espaço periplasmático contendo uma camada de

peptideoglicano e uma parede externa. Na parede externa existe uma estrutura formada por moléculas de constituição lipopolissacarídica, o LPS, composto pelos lipídios A, um oligossacarídeo central e uma cadeia polissacarídica mais exposta denominada cadeia O. A estrutura das brucelas rugosas é parecida com a das lisas, porém nas rugosas a cadeia O está totalmente ausente ou presente de forma residual (CORBEL, 1997).

O gênero é composto por nove espécies (FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008). *B.melitensis*, *B.suis* e *B.abortus* são espécies lisas. A *B.abortus* subdivide-se em sete biovars (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9), a *B.melitensis* em três (1, 2 e 3) e a *B.suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, embora apresentem variantes, não se subdividem em biovars (PAULIN & FERREIRA, 2003). As duas únicas espécies naturalmente rugosas são *B.canis* e *B.ovis* (CORBEL, 1997). As espécies *B.neotomae* e *B.microti*, isoladas de roedores silvestres, não são consideradas zoonóticas (CORBEL, 1997; SCHOLZ et al., 2008), assim como a *B.ovis*, que foi isolada apenas de ovinos naturalmente infectados (CORBEL, 1997). A *B.ceti* e *B.pinnipedialis*, patogênicas para mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2007), já foram associadas a granulomas intracerebrais em pacientes com neurobrucelose (SOHN et al., 2003), osteomielite da coluna vertebral (McDONALD et al., 2006) e a acidentes laboratoriais (BREW et al., 1999).

No Estado de Oregon, nos EUA, DE et al. (2008), relataram as características microbiológicas, bioquímicas e moleculares de uma linhagem de *Brucella* incomum (BO1) isolada de uma prótese de seio (silicone) de uma senhora com 71 anos de idade com sinais clínicos compatíveis. A análise inicial, incluindo teste de susceptibilidade bioquímica, análise de ácidos graxos e análise molecular baseada na reassociação do DNA-DNA e na presença de múltiplas cópias do IS 711, sugeriu que o isolado era uma *Brucella like organism*, mas a determinação de espécie, por meio de dados moleculares baseados no sequenciamento do 16S rARN e na análise sequencial multilocus, demonstrou que a BO1 era uma cepa incomum, atípica e nova de *Brucella*, denominada, por SCHOLZ et al. (2010), *Brucella inopinata*.

Recentemente uma nova espécie de brucela foi isolada, mas ainda não possui classificação nem está na lista oficial descrita pelo Subcomitê de Taxonomia da *Brucella* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF *BRUCELLA*, 2010). No Texas (EUA), SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al. (2009) descreveram e relataram pela primeira vez um novo isolado de *Brucella* associado a dois casos de morte neonatal em primatas (babuínos). As amostras do útero isoladas foram caracterizadas utilizando os testes bioquímicos tradicionais, PCR e sequenciamento de multilocus. Os isolados, morfologicamente, se assemelham a *Brucella*, embora suas características não sejam consistentes com qualquer espécie descrita.

Dentro do gênero *Brucella*, cada espécie possui hospedeiro preferencial: *B.abortus*, bovinos e bubalinos; *B.melitensis*, caprinos e ovinos; *B.suis*, suínos; *B.ovis*, ovinos; *B.canis*, canídeos (NICOLETTI, 1992); *B.neotomae* e *B.microti*, roedores silvestres (CORBEL, 1997; SCHOLZ et al., 2008); e as espécies *B.ceti* e *B.pinnipedialis*, mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2007).

A espécie mais patogênica e invasora para o homem é a *B.melitensis*, seguida de *B.suis*, *B.abortus* e *B.canis*, embora a penúltima seja a mais frequente causadora de infecções humanas no mundo (ACHA & SZYFRES, 2001). Até o presente momento, a *B.melitensis* não foi isolada no Brasil, sendo considerada exótica em nosso país (POESTER et al., 2002).

A brucelose é uma doença que ocorre em vários países, mas a distribuição das diferentes espécies de *Brucella* e de seus biovars apresenta variações geográficas. A *B.abortus* é a mais amplamente difundida. A *B.suis* tem uma distribuição irregular (ACHA & SZYFRES, 2001).

A brucelose suína foi diagnosticada pela primeira vez em 1904, na Hungria, por Von Hutyra, como doença infecciosa associada a abortos em suínos (HIPÓLITO et al., 1965). Em 1914, o veterinário norte-americano Jacob Traum isolou uma bactéria a partir de fetos suínos abortados, infecção essa que durante muitos anos acreditou-se que fosse causada pelo mesmo agente da brucelose dos

bovinos. Em 1929, Huddleson isolou o mesmo agente e classificou a espécie como *Brucella suis* (BATHKE, 1999).

No período de 1920 a 1950, nos EUA, esta enfermidade era considerada a que mais causava perdas entre os suínos na esfera reprodutiva (DEYOE, 1986).

Atualmente são conhecidos cinco biotipos ou biovars de *B.suis*; são eles os biovars 1, 2, 3, 4 e 5, sendo os biovars 1, 2 e 3 os mais importantes para os suínos (EWALT et al., 1997). O biovar 1 é o mais difundido mundialmente e o único isolado no Brasil (CALDAS et al., 1963; POESTER, 1978; ACHA & SZYFRES, 2001). O biovar 2 ocorre na Europa e, além do suíno, possui como reservatório a lebre europeia. O biovar 3, antes classificado como *B.melitensis* americana, é o predominante nos EUA. O biovar 4 é enzoótico em renas e alces (*Rangifer* sp.) na Sibéria, no Alaska e no Canadá. Não é patogênico para suínos e já foi isolado de casos de brucelose humana. O biovar 5 é o agente da brucelose em murinos (MACMILLAN, 1999). A *B.abortus* também pode infectar os suínos, porém é menos patogênica (ACHA & SZYFRES, 2001).

A brucelose suína pode representar um risco proporcionalmente maior que a brucelose bovina, pois apresenta um maior grau de patogenicidade para humanos. A *B.suis* pode ser encontrada em grande quantidade nos tecidos, proporcionando uma grande área de exposição para as pessoas que estão em contato com suínos (DEYOE, 1986).

A principal fonte de infecção de *B.suis* é o suíno. Essa bactéria é eliminada por meio do leite, do sêmen e, principalmente, do feto e dos anexos fetais no parto ou abortamento. O agente também é eliminado nas secreções durante todo o puerpério, contaminando pastagens, água, alimentos e fômites (DEYOE, 1986). Essas bactérias podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, ampliando de forma significativa a chance de o agente entrar em contato com um novo indivíduo suscetível e infectá-lo (LUSHSINGER et al., 1965).

O trato gastrointestinal e o reprodutivo são as principais portas de entradas da bactéria no hospedeiro susceptível. Os hábitos dos suínos e as características da enfermidade sugerem que o trato digestivo é a porta de entrada

mais comum. Os suínos infectam-se ao ingerir água ou alimentos contaminados ou ao comer fetos abortados e membranas fetais. Os leitões podem infectar-se a partir da mãe, pelo leite (MACMILLAN, 1999).

Suínos infectados, principalmente varões, ou sêmen não testado introduzidos em rebanhos livres podem disseminar a infecção (HUTCHING & ANDREWS, 1946), caracterizando uma doença sexualmente transmissível (MATOS et al., 2007).

Um animal pode adquirir a doença apenas por cheirar fetos abortados, pois a bactéria também pode entrar pelas mucosas do nariz e dos olhos (DEYOE, 1986). LEEK et al. (1993) demonstraram a possibilidade de infecção através da pele escarificada ou intacta, também por infecção experimental.

A brucelose pode manifestar-se de maneira distinta conforme o hospedeiro. Os suínos infectados apresentam febre regular ou intermitente, os sinais clínicos podem ser transitórios, e a morte é de rara ocorrência. Pode causar graves transtornos reprodutivos, tais como aborto, endometrite, orquite, perda da libido e infertilidade (MACMILLAN, 1999).

A patogênese dos diferentes biovars da *B.suis* (1, 2 e 3) é bastante similar, e as características das infecções são indistinguíveis. As brucelas penetram na mucosa gastrointestinal ou reprodutiva, em seguida colonizam os linfonodos regionais, ocorrendo multiplicação intracelular. As brucelas são bactérias intracelulares facultativas, mas a maior parte de sua multiplicação ocorre dentro de leucócitos. Com o desenvolvimento da linfadenite regional no sítio de entrada, as brucelas alcançam a circulação linfática e sanguínea, ocorrendo assim a bacteremia, que tem início de um a sete dias após a infecção, podendo ocorrer num intervalo de um a 34 meses, persistindo em média por cinco semanas; geralmente é contida nesse tempo. Após esse período, pode haver bacteremia intermitente (MACMILLAN, 1999).

Com a bacteremia, a *B.suis* atinge os órgãos de eleição (aparelho reprodutor masculino, útero, tecido ósseo e articular), podendo também ser isolada de um grande número de órgãos e tecidos. À medida que o tempo passa, esse número de locais tende a diminuir, sendo encontrada principalmente nos

linfonodos, no sistema genital, no baço, no fígado, no rim, na glândula mamária, no fluído sinovial e na medula óssea (DEYOE & MANTHEI, 1967).

As brucelas possuem especial predileção por útero gravídico. KEPPIE et al. (1965) demonstraram que um açúcar chamado eritritol estimula o crescimento da *Brucella* e que certas espécies susceptíveis, como bovinos, suínos, caprinos e ovinos, possuem na placenta níveis de eritritol muito mais altos que outras espécies como homem, coelho, rato e cobaia. O sistema reprodutor masculino daquelas espécies também contém eritritol. A presença desse açúcar contribui, pelo menos em parte, para a proliferação da bactéria. De acordo com ENRIGHT & SAMARTINO (1994), é possível que estrógenos também sejam responsáveis por estimular o crescimento de *Brucella* em ruminantes. Após o parto ou aborto, a *Brucella* não persiste por muito tempo no útero. A presença de grande quantidade de eritritol no útero gravídico e sua acentuada diminuição após o parto poderiam explicar aquele desaparecimento.

A *Brucella* penetra nas células epiteliais do córion, produzindo uma placentite. Ocorre também endometrite com ulceração do epitélio uterino. No feto, provoca edema, congestão pulmonar, hemorragias no epicárdio e na cápsula esplênica. A presença da bactéria induz uma inflamação das membranas fetais. Essa interferência com a circulação do feto poderia explicar a ocorrência do aborto. O feto abortado geralmente apresenta acúmulo de líquidos serosos nos tecidos, o que seria indício de distúrbios circulatórios (GILLESPIE & TIMONEY, 1981).

Em suínos infectados pela *B.suis*, o aborto pode ocorrer em qualquer época da gestação, sendo mais influenciado pelo tempo de exposição ao agente do que pelo período da gestação (MACMILLAN, 1999). A taxa de aborto é mais alta entre porcas infectadas por via genital, durante o acasalamento (DEYOE & MANTHEI, 1967) ou por inseminação artificial. Na espécie suína, a morte de neonatos e morte embrionária precoce são mais frequentes do que a ocorrência de abortos. Pode ocorrer retenção de placenta e endometrite, com o útero apresentando-se congesto, hemorrágico e edemaciado, havendo liberação de

exsudato catarral de origem uterina, que contém grande quantidade de *B.suis* (KENNEDY & MILLER, 1993).

A infecção genital tende a ser mais persistente nos machos do que nas fêmeas, porque as alterações patológicas nas glândulas sexuais acessórias e nos testículos são mais extensas que no útero, e geralmente são irreversíveis. Além de infertilidade e orquite, comumente ocorre infecção nas glândulas acessórias e com isso há eliminação de grande quantidade de *B.suis* no sêmen (MACMILLAN, 1999).

As lesões articulares, como sinovites, também são bastante comuns na brucelose suína e caracterizam-se por reações purulentas ou fibropurulentas que afetam principalmente as grandes articulações (KENNEDY & MILLER, 1993). Em leitões, é comum a brucelose manifestar-se sob a forma de espondilite, embora, ocasionalmente, essa forma possa ser observada em suínos de qualquer idade. As espondilites caracterizam-se como reações inflamatórias ou lesões granulomatosas localizadas principalmente nos discos intervertebrais das regiões lombar e sacral, associadas com paralisia dos membros posteriores (MACMILLAN, 1999).

As informações epidemiológicas e um adequado histórico de rebanho representam auxílio muito importante no diagnóstico da brucelose suína. Isso porque o método mais sensível e específico é o isolamento do microrganismo, por meio de técnicas de cultura realizadas a partir de produtos de abortos, suabes vaginais, lesões testiculares, abscessos, linfonodos e sangue (ALTON, 1990; ROGERS et al., 1989). Entretanto, nem sempre se encontram condições para esse procedimento.

Na brucelose animal, assim como em outras infecções, o isolamento do microrganismo é o método diagnóstico mais seguro, mas, em consequência das dificuldades desse procedimento e da sua limitação para o uso em grandes rebanhos, os métodos sorológicos são os mais utilizados (DEYOE, 1969).

Numerosos testes sorológicos são utilizados no diagnóstico da brucelose suína, e na maioria deles, emprega-se como antígeno suspensão de *B.abortus*

1.119/3, pois a *B.suis* possui antígenos lipopolissacarídeos de superfície muito similares aos da *B.abortus* (PAYEUR et al., 1990).

Os testes sorológicos não possuem valor absoluto no diagnóstico individual, apesar de possuírem muito valor no diagnóstico de rebanhos. Isso porque suínos infectados podem produzir pouco ou não produzir anticorpos contra *Brucella*, o que acarreta a obtenção de resultados falso-negativos. Também podem ocorrer resultados falso-positivos induzidos por reações cruzadas com diversos microrganismos como *Escherichia coli* sorogrupo O:157, *Salmonella* sorovar Kaufman-White grupo N, e a mais importante, *Yersinia enterocolitica* sorotipo O:9 (MACMILLAN, 1999).

Diversas técnicas sorológicas já foram desenvolvidas para o diagnóstico da brucelose: soroaglutinação rápida em placa, antígeno acidificado tamponado, teste do rivanol, reação de fixação de complemento, imunodifusão em ágar-gel, soroaglutinação lenta em tubo, prova do 2-mercaptoetanol, entre outras (LEEK et al., 1993).

Não existe uma vacina disponível no mercado brasileiro para *B.suis*. Vacinas contra *B.abortus* não apresentam bons resultados no controle da brucelose suína (ALTON, 1990).

Um importante instrumento de controle de *B.suis* é o estabelecimento e manutenção de rebanhos fechados, livres da brucelose. A implementação de programas que estabelecem a identificação periódica, por meio de testes diagnósticos, de casos positivos da doença tem eliminado um grande número de rebanhos infectados (SPENCER & MATTISON, 1975).

A legislação brasileira que regulamenta a profilaxia da brucelose suína é a Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, pela qual a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece normas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. Essa norma determina que sejam realizadas provas sorológicas para brucelose com intervalos de seis meses, utilizando o teste do antígeno tamponado ou outro aprovado pelo MAPA e indicado para o caso. Os soros reagentes devem ser submetidos às provas confirmatórias, como fixação de complemento ou

soroaglutinação lenta realizada simultaneamente ao 2-mercaptoetanol. A granja de reprodutores é considerada livre da infecção se todos os testes realizados forem negativos (BRASIL, 2002).

No caso de positividade, a granja tem sua certificação suspensa, os animais positivos devem ser eliminados e realizados novos testes no plantel em até 30 dias. Persistindo a positividade, a granja perde a certificação (BRASIL, 2002). Os casos não previstos nesta Instrução Normativa são resolvidos pelo Departamento de Defesa Animal.

Em rebanhos comerciais produtores de carne, é recomendada a despopulação completa, como medida mais eficiente de controle. Deve ser realizada uma desinfecção e, após um vazio sanitário, a reposição com suínos sadios (MATOS et al., 2007). A repopulação da propriedade com suínos livres da infecção, testados sorologicamente, deve ser realizada após o período de seis meses. Entretanto, a despopulação completa é uma alternativa de controle que resulta em impacto econômico elevado (CARVALHO NETA et al., 2005).

São poucos os estudos realizados visando à identificação das biovariedades de *Brucella* isoladas de suínos no Brasil, e apenas o biovar 1 da *Brucella suis* já foi isolado (CALDAS et al., 1963; POESTER, 1978; ACHA & SZYFRES, 2001). O último relato da prevalência em suínos no Brasil mostra uma taxa de 0,34% (BRASIL, 2000). Vários estudos sobre a situação da brucelose suína foram feitos, mas ainda existe muita subnotificação nesta espécie.

A proposta desse estudo foi avaliar o desempenho de testes sorológicos (antígeno acidificado tamponado, soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol, fixação de complemento, antígeno acidificado tamponado após tratamento com rivanol, e polarização fluorescente) no diagnóstico da brucelose suína, analisando os aspectos epidemiológicos dessa enfermidade, por meio de dados de um foco ocorrido no Município de Jaboticabal em 2006 e de animais não infectados abatidos em frigorífico do Estado de São Paulo, abordando etiologia, cadeia epidemiológica, diagnóstico, controle, prevenção e saúde pública.

1.3 REFERÊNCIAS¹

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. v.1. Bacteriosis y micosis. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p.28-56, 2001.

ALTON, G.G. *Brucella suis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, CRC Press, p.411-422, 1990.

BATHKE, W. Brucelose In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. Roca, São Paulo, p.163-178, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, 2000. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**. v.30, p.39-50, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002. Aprova as normas a serem cumpridas para a certificação de granjas de reprodutores suídeos. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de março de 2002. p.3-4.

BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; MACMILLAN, A.P.; STAUNTON, N. J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. **Veterinary Record**, v.144, p.483, 1999.

CALDAS, A.D.; OLIVEIRA Jr., B.S.; CASTRO, A.F.P. Tipificação de amostras de *Brucella suis* isoladas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.30, p.153-157, 1963.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **Journal of Infection**, v.45, p.122-127, 2002.

CARVALHO NETA, A.V.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Brucelose suína. In: **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, CRMV-MG**, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEP-MVZ Editora, n.47, 2005.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.2, p.213-221, 1997.

¹ De acordo com as normas da ABNT-NR 6023.

DE, B.K.; STAUFFER, L.; KOYLASS, M.S.; SHARP, S.E.; GEE, J.E.; HELSEL, L.O.; STEIGERWALT, A.G.; VEGA, R.; CLARK, T.A.; DANESHVAR, M.I.; WILKINS, P.P.; WHATMORE, A.M. Novel *Brucella* Strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.1, p.43-49, 2008.

DEYOE. B.L.; MANTHEI, C.A. Sites of localization of *Brucella suis* in swine. **Proceedings of the 71 Annual Meeting Journal of the United States Livestock Sanitary Association**, p.102-108, 1967.

DEYOE. B.L. Diagnostic tests for swine brucellosis. **Proceedings of the 53th Annual Meeting Livestock Conservation**, p.20-22, 1969.

DEYOE, B.L. Brucellosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 6th ed. Iowa State University Press: Ames, p.599-607, 1986.

ENRIGHT, F.M.; SAMARTINO, L.E. Mechanism of abortion in *Brucella abortus* infected cattle. **Proceedings of the United States Animal Health Association**, v.98, p.88-95, 1994.

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; RHYAN, J.C.; GEER, P.L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.417-420, 1997.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J. ; JACQUES,I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.2688-2693, 2007.

GILLESPIE, J.H.; TIMONEY, J.F. **Hagan and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals**. 7 ed. Ithaca, Cornell University Press, 1981, 851p.

HIPÓLITO, O.; FREITAS, M. G.; FIGUEIREDO, J.B. **Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos**. 4ª Ed. Melhoramentos, 1965.

HUTCHING, L.M.; ANDREWS, F.N. Studies on brucellosis in swine; *Brucella* infection in the boar. **American Journal of Veterinary Research**, v.7, 379-384, 1946.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON BACTERIAL TAXONOMY. **SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF BRUCELLA**, 2010. Disponível em: <<http://www.the-csp.org/subcoms/Brucella.htm>>. Acesso em: 10 abril de 2010.

KENNEDY, P.C.; MILLER, R.B. The female genital system: Diseases of the pregnant uterus. In: **Pathology of Domestic Animals**. 4ed, Academic Press, v.3, p.349-370, 1993.

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A.E.; WITT, K.; SMITH, H. The role of erythritol in the tissue localization of the *Brucellae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.46, p.104-108, 1965.

LEEK, M.L.; VAN DER BECKER, H.N.; HUMPHREY, P.; ADAMS, C.L.; BELDEN, R.C.; FRNKENBERGER, W.B.; NICOLETTI, P.L. Prevalence of *Brucella* sp antibodies in feral swine in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v.29, p.410-415, 1993.

LUSHSINGER, D.W.; ANDERSON, R.K., WERRING, D.F. A swine brucellosis epizootic. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.147, p.632-636, 1965.

MACMILLAN, A.P. *Brucellosis*. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, W.L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press: Ames, p.385-393, 1999.

McDONALD, W.L., JAMALUDIN, R., MacKERETH, G.; HANSEN, M.; HUMPHREY, S.; SHORT, P.; TAYLOR, T.; SWINGLER, J.; DAWSON, C. E.; WHATMORE, A. M.; STUBBERFIELD, E.; PERRETT, L. L.; SIMMONS, G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4363-4370, 2006.

MATOS, M.C.; OLIVEIRA, S.J.; SOBESTIANSKY, J. Brucelose In: SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D. **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, p.64-68, 2007.

NICOLETTI, P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health Production**, v.24, n.1, p.40-44, 1992.

PAULIN, L. M.; FERREIRA, J. S. **Combate à Brucelose Bovina. Situação Brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003, p.154.

PAYEUR, J.B.; MILLER, C.D.; HENNAGER, S.G. ; EWALT, D.R. Comparison of five serologic tests and culture for brucellosis in swine experimentally infected with *Brucella suis* biovar 1. **Proceedings of the 94th Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.94, p.147-152, 1990.

POESTER, F.P. Isolamento de *Brucella abortus* e *suis* respectivamente em bovinos e suínos do RS e SC. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.5, p.27-31, 1978.

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

ROGERS, R.J. ; COOK, D.R.; KETTLERER, P.J.; BALDOCK, F.C.; BLACKALL, P.J.; STEWART, R.W. An evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v.66, p.77-80, 1989.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; KOYLASS, M.S.; CUMMINS, L.B.; DICK J.R.; SNIDER, C.L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J.L.; NATHANIELSZ, P.W.; HUBBARD, G.B. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. **Journal of Medical Primatology**, v.38, p.70-73, 2009.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.A.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMONT, M.S.; WHATMORE, A.M.; FALSÉN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSS, H.J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.375-382, 2008.

SCHOLZ, H.C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMONT, M.S.; WHATMORE, A.M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H.J.; DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov. isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60, p. 801-808, 2010.

SOHN, A.H.; PROBERT, W.S.; GLASER, C.A.; GUPTA, BOLLEN, A.W.; WONG, J.D.; GRACE, E.M.; N.; MCDONALD, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.485- 488, 2003.

SPENCER, P.L.; MATTISON, J.R. Pike County, Illinois, swine brucellosis project. **Proceedings of the 70th Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.79, p.86-91, 1975.

CAPÍTULO 2 – RELATO DE UM FOCO DE BRUCELOSE SUÍNA OCORRIDO EM JABOTICABAL, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO – A *Brucella suis* é um dos mais importantes agentes etiológicos da brucelose humana, mas com a evolução do manejo na suinocultura a ocorrência de brucelose suína tem diminuído, assim como a incidência da infecção por *B.suis* em humanos. Em julho de 2006 foi detectado um surto de brucelose suína que afetou uma granja no Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. Na granja havia aproximadamente 300 matrizes suínas e 1.500 animais na fase de terminação. Muitas matrizes abortaram, outras apresentaram descarga vaginal, e três delas, paralisia de membros posteriores. De 271 matrizes examinadas, 254 (93,7%) foram positivas na reação de fixação de complemento (RFC), e de 62 animais da terminação, 17 (27,4%) foram positivos nessa prova. O biovar 1 de *B.suis* foi cultivado a partir de material de 14 fetos e de 6 matrizes necropsiadas na fazenda. A identificação foi confirmada por provas de rotina. Catorze trabalhadores da granja foram submetidos a provas sorológicas, e três deles apresentaram títulos de anticorpos contra brucelas lisas na prova de aglutinação. Uma mulher de 39 anos, que trabalhava na maternidade da granja e que tinha contato direto com os abortos fetais, apresentou um título de 480 UI/mL e sinais clínicos. Essas informações indicam que, apesar da redução da incidência de brucelose suína no Brasil, infecção por *B.suis* ainda ocorre, sendo um risco para a saúde humana e animal.

Palavras-chave: Isolamento, *Brucella suis*, testes sorológicos, infecção humana, sinais clínicos

REPORT OF AN OUTBREAK OF SWINE BRUCELLOSIS IN JABOTICABAL, STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

SUMMARY - *Brucella suis* was one of the main agent of human brucellosis, but with changes in swine management the occurrence of swine brucellosis has decreased, and so did the incidence of *B.suis* infection in humans. An outbreak of swine brucellosis affecting a herd in Jaboticabal, State of São Paulo, Brazil, was detected in July 2006. The herd was composed by approximately 300 sows and 1,500 fattening animals. Many sows within this herd have aborted, others have showed vaginal discharges, and 3 sows have showed posterior paralysis. Among 271 sows, 254 (93.7%) tested positive for brucellosis by the complement fixation, and among 62 randomly bled fattening animals, 17 (27.4%) tested positive. *B.suis* biovar 1 was cultured from 14 aborted fetuses and 6 sows. *Brucella* identification was accomplished by routine methods. Fourteen farm workers were tested by the agglutination test, and 3 of them had antibody titers to smooth *Brucella*. A 39 years old woman, who worked at the pig maternity ward and had direct contact with aborted fetuses, presented a titer of 480 IU/mL and clinical signs. These informations indicate that, in spite of the reduction of swine brucellosis prevalence in Brazil, *B.suis* infection still occurs, posing a risk to animal and human health.

Key Words: *Brucella suis* isolation, serological tests, human infection, clinical signs

2.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose é uma antroponose, de evolução crônica, que acomete muitas espécies animais; o ser humano infecta-se acidentalmente. A sintomatologia da brucelose no homem inclui calafrios, suores profusos, fraqueza e fadiga. A temperatura pode oscilar do normal pela manhã até 40°C à tarde. Outros sintomas são insônia, impotência sexual, constipação, anorexia, dores de cabeça, artralgia e mal-estar em geral (ACHA & SZYFRES, 2001).

Várias espécies de *Brucella* podem infectar o homem, e a *B.suis*, o agente etiológico da brucelose suína, é a espécie mais frequentemente responsável pelas infecções humanas (BUSCH & PARKER, 1972), principalmente em áreas livres da *B.melitensis* (TAYLOR & PERDUE, 1989).

No Brasil, somente o biovar 1 da *B.suis* já foi isolado (CALDAS et al., 1963; POESTER, 1978; ACHA & SZYFRES, 2001) e poucos são os achados de brucelose suína no país. A proporção de animais reagentes decresceu de 2,19% em 1981 (GARCIA-CARRILLO, 1983) para 0,34%, segundo os últimos dados disponíveis (BRASIL, 2000). SILVA et al. (1984) constataram uma prevalência de 0,65% entre suínos de granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais. Há também na literatura brasileira relatos de isolamento de *B.suis* por MIRANDA et al. (1978), no Estado de São Paulo, que cultivaram brucela de um cachaço com orquite, e por POESTER (1978), que registrou o cultivo de *B.suis* a partir do baço de suínos, em Santa Catarina.

A brucelose suína pode representar um risco proporcionalmente maior que a brucelose bovina, pois o agente etiológico é mais patogênico para humanos. A *B.suis* pode ser encontrada em grande quantidade nos tecidos, proporcionando uma grande área de exposição para as pessoas que estão em contato com suínos (DEYOE, 1986).

Os sinais clínicos da brucelose em suínos são aborto, infertilidade, orquite, paralisia de membros posteriores e claudicação (DEYOE, 1986). Lesões macroscópicas provocadas pela brucelose em suínos são bastante variáveis. Pode ocorrer formação de abscessos nos órgãos afetados, com necrose e

descamação em uma porção significativa da membrana mucosa dos mesmos (MACMILLAN, 1999).

A doença é enzootica na América Latina, que foi considerada a região de maior prevalência (MATYAS & FUJIKURA, 1984), mas a tecnificação da suinocultura e os programas sanitários propiciaram condições para o controle da brucelose, e isso tem se refletido em diminuição nas taxas de prevalência da infecção nessa espécie animal. Pesquisas sorológicas em criações suínas em algumas regiões do Brasil mostram que esta enfermidade não é mais um sério problema sanitário em granjas tecnificadas (MORES & ZANELLA, 2006).

A diminuição da prevalência da brucelose suína reflete-se na diminuição da incidência da infecção humana por *B.suis*, embora o agente etiológico não tenha sido erradicado ainda do nosso país. Este capítulo descreve um surto de brucelose suína por *B.suis* associado à infecção humana e canina em uma granja do Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

- Descrever um foco de brucelose suína ocorrido no Município de Jaboticabal em 2006.

2.2.2 Objetivos específicos

- Confirmar o diagnóstico de brucelose suína por meio de isolamento e identificação do agente e por testes sorológicos;
- Verificar a disseminação da infecção, examinando todas as matrizes do rebanho e parte dos suínos da terminação, por amostragem;
- Avaliar a transmissão da infecção para outras espécies animais da propriedade, testando sorologicamente, bovinos, equinos, ovinos, cães, aves;
- Avaliar a transmissão da infecção para as pessoas que viviam e trabalhavam na propriedade;
- Investigar, por meio de testes de diagnóstico e informações epidemiológicas, a introdução do agente etiológico no rebanho.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Características da propriedade

O rebanho suíno, localizado no Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1), era composto por aproximadamente 300 matrizes e 1.500 animais de terminação criados de forma intensiva. Não havia nenhum cachaço utilizado para cobertura das fêmeas no cio, apenas dois rufiões; a reprodução era realizada por inseminação artificial. Na propriedade havia diversas espécies animais, entre elas, bovinos, equinos, ovinos, cães e gansos, que tinham acesso a pastagens irrigadas com dejetos dos suínos sem prévio tratamento. Catorze funcionários desenvolviam as atividades da granja, em todas as etapas da criação (Figura 2).

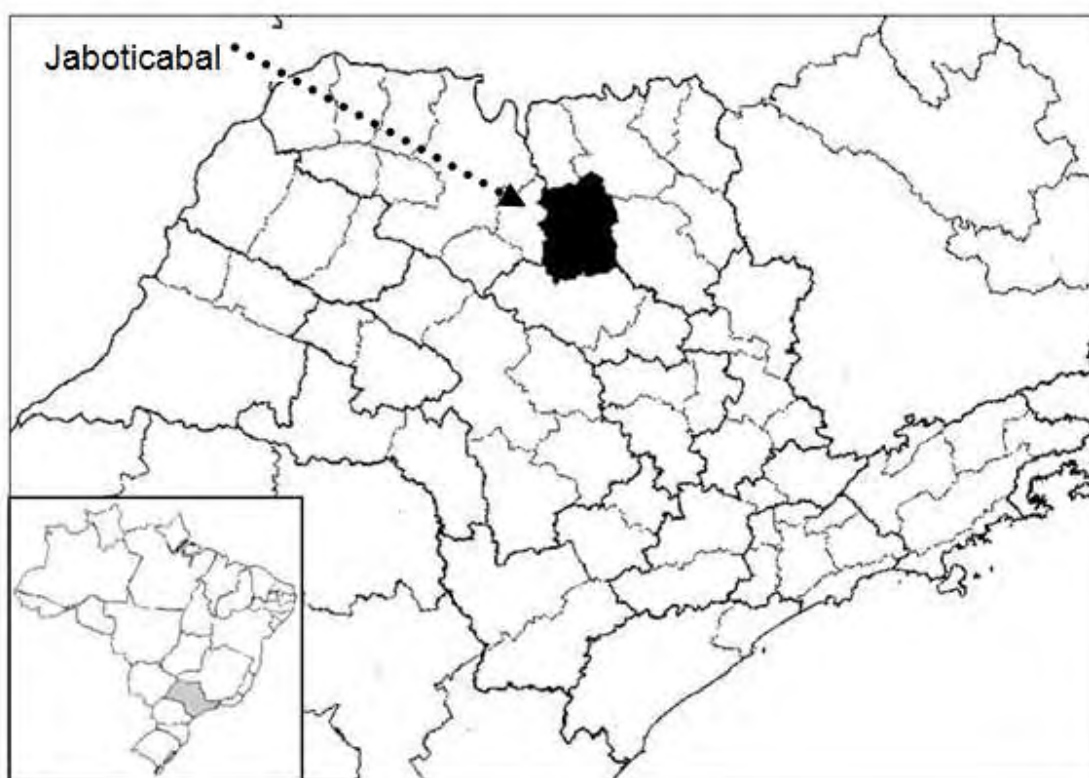


Figura 1. Localização do município onde ocorreu o foco de brucelose suína, em 2006. Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil.



Figura 2. Etapas da criação na propriedade do surto. Instalação das matrizes suínas infectadas (Foto A), maternidade (Foto B), creche (Foto C) e terminação (Foto D). Jaboticabal, 2006.

2.3.2 Obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue sem anticoagulante de 271 matrizes suínas da propriedade (Figura 3 Foto A) e de 62 suínos da terminação (Figura 3 Foto B) selecionados; o tamanho de amostra foi estabelecido de acordo com a Instrução Normativa nº 19, de 19/02/2002 (BRASIL, 2002). Para a verificação da transmissão da infecção para outras espécies na propriedade, também foram colhidas amostras de sangue de 33 bovinos, 126 ovinos, 5 equinos, 13 cães e 25 gansos (Figura 3 Foto C, Foto D, Foto E, Foto F e Foto G). Também foram

colhidas amostras de sangue dos 7 cachacos da propriedade que fornecia sêmen para a inseminação artificial das matrizes.



Figura 3. Colheita de sangue dos animais da fazenda. Matrizes (Foto A), animais da terminação (Foto B), bovinos (Foto C), ovinos (Foto D), equinos (Foto E), cães (Foto F) e gansos (Foto G). Jaboticabal, 2006.

Para a identificação do agente etiológico, foi feita a colheita de conteúdo estomacal, pulmão, baço, fígado, líquido fetal, linfonodo e placenta provenientes de 14 fetos abortados; e linfonodos, líquido, ovário, fígado e baço de 6 matrizes suínas sacrificadas e necropsiadas na propriedade; além do sêmen dos suínos utilizados para inseminação artificial das matrizes da propriedade, e linfonodo submandibular, ovários, baço e fígado de 3 vacas que foram abatidas em frigorífico.

Todo material colhido dos animais foi encaminhado ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, onde foi processado e examinado.

Os 14 trabalhadores da granja foram submetidos a um exame clínico realizado por um médico, e seus soros sanguíneos foram submetidos ao diagnóstico sorológico da brucelose pelo teste de aglutinação em tubo, em um laboratório de análises clínicas humanas.

2.3.3 Técnicas laboratoriais

2.3.3.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e “card test”, é o teste de triagem usado na rotina e foi realizado conforme a técnica recomendada no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006).

O método consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03 mL do antígeno, em uma placa de vidro quadriculada, homogeneizar e manter a placa em movimentos rotatórios lentos e constantes até o momento da leitura, que é feita após quatro minutos de reação, observando, com ou auxílio de uma caixa com luz (ou aglutinoscópio), se há ocorrência dos grumos de aglutinação (resultado positivo) ou não (resultado negativo). O antígeno empregado nessa técnica é preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração de 8,0% de volume celular, corado com rosa de Bengala, pH 3,65.

2.3.3.2 Teste do 2-mercaptoetanol (ME)

Essa técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006).

Foi utilizado antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Como diluente foi empregada solução salina 0,85%, com uma concentração final de 0,1 M de 2-mercaptoetanol. Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação. O teste do ME foi realizado simultaneamente ao teste de SAL.

2.3.3.3 Teste de soroaglutinação lenta (SAL)

Também chamada de teste de soroaglutinação em tubos (SAT), essa prova é utilizada em associação com o teste do ME para confirmar resultados positivos na prova de triagem. A técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006).

A técnica baseia-se no emprego de antígeno de célula total (antígeno para soroaglutinação lenta), preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, na concentração final de 0,045% de volume celular. Foi utilizada como diluente solução salina 0,85%, com uma concentração de 0,5% de fenol. Os soros foram testados em diluições duplas a partir da diluição 1/25, trabalhando-se com volume final de 2 mL da mistura diluente-soro-antígeno. A leitura foi realizada após incubação por 48 horas a 37°C, observando-se a formação de grumos de aglutinação.

Em bovinos, a interpretação dos resultados dessa prova é realizada juntamente com a prova do ME, considerando-se o grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições. A reação é classificada como: completa (+), incompleta (I) ou negativa (-), de acordo com o PNCEBT. Devido ao fato de não se vacinar a espécie suína, os resultados dos testes de SAL e ME foram interpretados de acordo com o quadro do PNCEBT correspondente a bovinos não vacinados (BRASIL, 2004).

2.3.3.4 Reação de fixação de complemento (RFC)

Foi utilizado o mesmo antígeno empregado no teste de soroaglutinação lenta em tubos (*Brucella abortus* amostra 1119/3). A diluição do antígeno foi determinada por titulação em bloco, escolhendo-se como diluição a metade da diluição em reatividade ótima. Como complemento foi usada uma mistura de soros sanguíneos de várias cobaias. Esse complemento foi titulado como descrito por ALTON et al. (1988), usando 20 vezes o volume empregado na microtécnica, para determinar o volume que continha uma unidade hemolítica 50%. Para uso no teste, o complemento foi diluído de modo a conter 5 unidades hemolíticas 50%.

Foi empregado sistema hemolítico formado por suspensão de hemácias de carneiro padronizada em espectrofotômetro para a concentração de 0,95g de hemoglobina por 100 mL, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que consiste de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro, titulada conforme a recomendação de ALTON et al. (1988).

Foi empregada a microtécnica descrita por ALTON et al. (1988), com incubação a 37°C por 30 minutos nas duas fases da reação. O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”. Colocaram-se 25 µL de soro, inativado em banho-maria a 58°C por 30 minutos, em diluições duplas, de 1/2 a 1/128, 25 µL de antígeno e 25 µL de complemento. Em seguida, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 25 µL do sistema hemolítico, e, após agitação em agitador de

microplacas, o material foi novamente incubado nas condições mencionadas acima. Imediatamente após a incubação, as placas foram colocadas na geladeira, a fim de interromper a ação do complemento, sendo, em seguida, centrifugadas a 700 G por 5 a 10 minutos. A leitura foi realizada comparando os resultados com uma escala de hemólise e observando o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante. O título foi obtido pela recíproca da maior diluição do soro com pelo menos 25% de fixação de complemento, sendo considerado positivo o soro com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4 (ALTON et al., 1988).

2.3.3.5 Cultivo, isolamento e identificação bacteriológica

Para o cultivo e isolamento bacteriológico, as amostras foram semeadas em meio Ágar *Brucella*, enriquecido com 10% de soro de coelho e incubadas a 37°C em estufa com uma concentração de 5% de CO₂. Foram analisadas amostras de linfonodos, líquido, ovário, fígado e baço de 6 matrizes suínas sacrificadas e necropsiadas na propriedade. De 14 fetos abortados, foram analisadas amostras de conteúdo estomacal, pulmão, baço, fígado, líquido fetal, linfonodo e placenta. Dos 7 cachos destinados a inseminação artificial das matrizes, foi analisado sêmen. Também foram analisadas amostras de linfonodo submandibular, ovários, baço e fígado de 3 vacas, abatidas em frigorífico.

A identificação e tipificação da *Brucella* foi realizada no Instituto de Patobiología do Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária (INTA), em Buenos Aires, Argentina, por aspectos morfológicos de colônia; técnica de Gram; crescimento em atmosfera com e sem CO₂; crescimento em meio com antibióticos (meio de Farrell); atividade de fucsina, tionina, azul de tionina, urease, acriflavina e produção de H₂S, para a diferenciação de biovars.

2.4 RESULTADOS

Durante o ano de 2006, na granja com foco de brucelose, foram observados abortamentos em 99 matrizes, em diversos estágios de gestação (Figura 4 Foto A), e muitas matrizes suínas apresentaram repetição de cio alguns dias após a inseminação artificial. Trinta e cinco apresentaram descarga vaginal (Figura 4 Foto B) e 3 manifestaram paralisia dos membros posteriores (Figura 4 Foto C, Foto D e Foto E).



Figura 4. Sinais clínicos apresentados por algumas das matrizes suínas naturalmente infectadas por *Brucella suis*. Fetos abortados (Foto A). Descarga vaginal (Foto B). Paralisia de membros posteriores (Foto C, Foto D e Foto E). Jaboticabal, 2006.

Seis matrizes foram necropsiadas na propriedade. Uma delas apresentou abscessos esplênicos (Figura 5 Foto A), e em outra porca havia aderência do intestino delgado (Figura 5 Foto B).

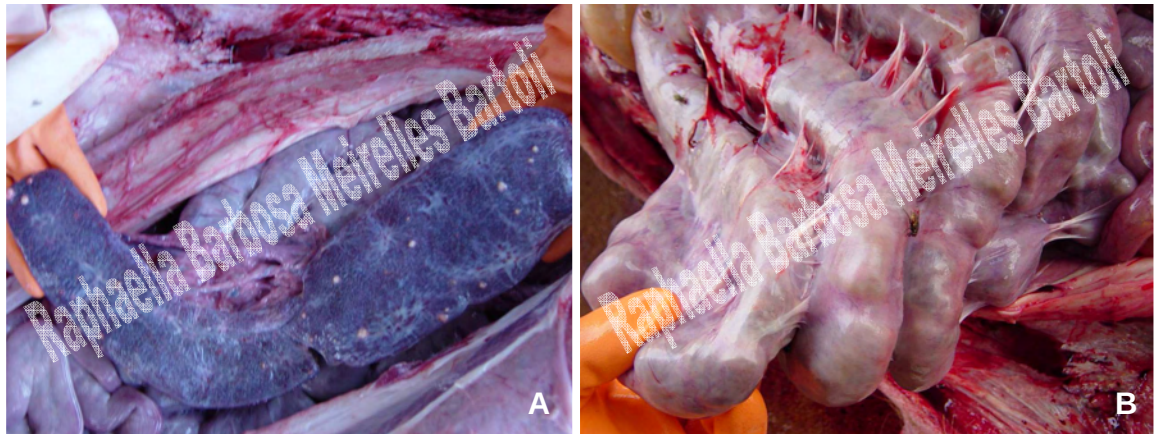


Figura 5. Achados anatomopatológicos apresentados pelas matrizes suínas naturalmente infectadas por *Brucella suis* necropsiadas na fazenda. Abscessos esplênicos (Foto A). Aderências no intestino delgado (Foto B). Jaboticabal, 2006.

Um cocobacilo, Gram-negativo, foi cultivado a partir de materiais colhidos de 14 fetos abortados (conteúdo estomacal, baço e fígado) e de 6 matrizes suínas (linfonodos, baço e fígado). Os cultivos foram capazes de crescer em atmosfera com e sem CO₂, em meio com antibióticos (meio de Farrell) e em meio com tionina 1:50.000, mas não em fucsina 1:50.000, apresentaram urease positiva e produção de H₂S, mas o teste de acriflavina foi negativo, indicando assim o isolamento de *B.suis* biovar 1 (Tabela 1). As amostras provenientes das 3 vacas abatidas no frigorífico não apresentaram crescimento, nem o sêmen que era utilizado na inseminação artificial das matrizes da propriedade onde ocorreu o surto.

Tabela 1. Resultados dos testes de identificação de *Brucella suis* biovar 1 de amostras de fetos suínos abortados e das matrizes suínas naturalmente infectadas. Jaboticabal, 2006.

Métodos	Resultados
Crescimento em atmosfera com CO ₂	Positivo
Crescimento em atmosfera sem CO ₂	Positivo
Crescimento em meio com antibióticos (meio de Farrell)	Positivo
Crescimento em meio com tionina 1:50.000	Positivo
Crescimento em meio com fucsina 1:50.000	Negativo
Acriflavina	Negativo
Produção de H ₂ S	Positivo
Urease	Positivo
Morfologia e técnica de Gram	Cocobacilo Gram-negativo

Das 271 matrizes submetidas a testes sorológicos, 257 (94,8%) foram positivas no AAT, 250 (92,2%) foram positivas no SAL+ME e 254 (93,7%) positivos na RFC (Tabela 2). Dos 62 animais da terminação testados, 19 (30,6%) foram positivos no AAT, 15 (24,2%) foram positivos no SAL+ME e 17 (27,4%) foram positivos na RFC (Tabela 3).

Não foi possível testar sorologicamente os 2 rufiões que viviam na propriedade, pois foram abatidos e enterrados antes do início deste estudo.

Tabela 2. Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo das matrizes no diagnóstico da brucelose suína. Jaboticabal, 2006.

Testes Sorológicos	Positivo		Negativo		Total
	Número	%	Número	%	
AAT	257	94,8	14	5,2	271
SAL+2-ME	250	92,2	16	5,9	271
RFC	254	93,7	17	6,3	271

Tabela 3. Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo dos animais da terminação no diagnóstico da brucelose suína. Jaboticabal, 2006.

Testes Sorológicos	Positivo		Negativo		Total
	Número	%	Número	%	
AAT	19	30,6	43	69,4	62
SAL+2-ME	15	24,2	45	72,6	62
RFC	17	27,4	45	72,6	62

Todos os 33 bovinos, 5 equinos, 126 ovinos e 25 gansos foram negativos no AAT, embora eles se alimentassem de pastos irrigados com dejetos sem tratamento prévio das matrizes infectadas. Entretanto, 3 dos 13 cães da fazenda foram positivos no AAT. Dois deles, ambos machos, foram positivos nos testes SAL+ME e RFC, um deles, uma fêmea, foi negativa no SAL+ME, mas teve títulos baixos (1:4) na RFC.

Os cães tinham acesso à instalação das matrizes infectadas e contato direto com os fetos suínos abortados (Figura 6 Foto A e Foto B). Um dos machos com sorologia positiva apresentava orquite, e o outro, dermatite escrotal. Nenhum outro sinal clínico foi observado.

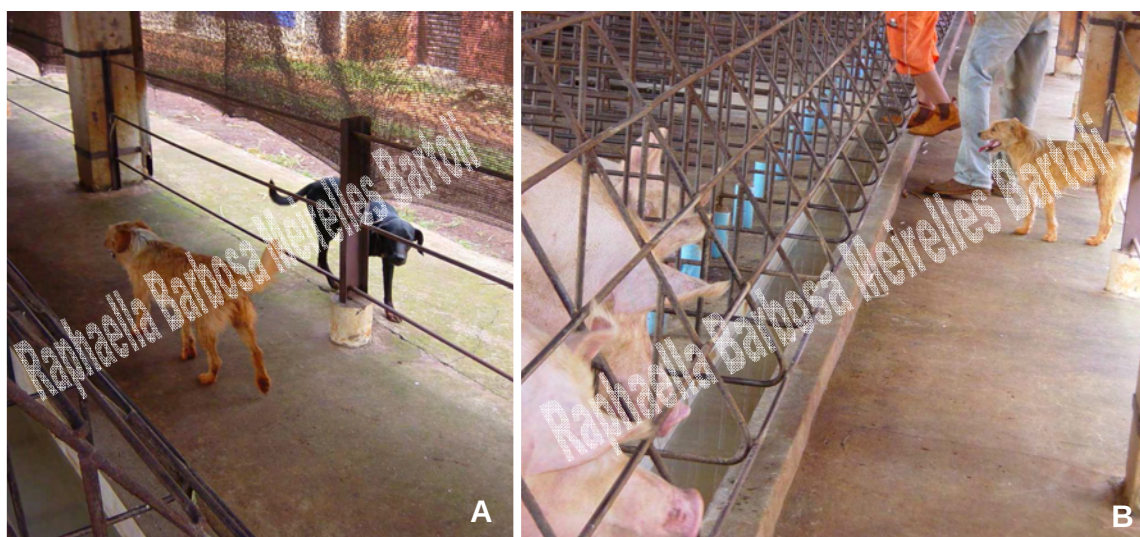


Figura 6. Cães na instalação das matrizes suínas naturalmente infectadas (Foto A e B). Jaboticabal, 2006.

Dos 14 trabalhadores da propriedade, 3 apresentaram títulos de anticorpos contra brucelas lisas na prova de aglutinação.

Uma mulher, de 39 anos, que trabalhava na seção de maternidade suína e tinha contato direto com os fetos abortados, apresentou título de 480 UI/mL e sinais clínicos da doença (febre intermitente, suores noturnos profusos, fraqueza, mal-estar); um homem, de 27 anos, apresentou título de 200 UI/mL; e outro, de 25 anos, títulos de 60 UI/mL; ambos tinham contato direto com os fetos, mas não apresentaram sintomatologia (Tabela 4).

Em conversa com os trabalhadores, foi verificado que, além do contato direto com os fetos suínos abortados, das três pessoas que apresentaram títulos de anticorpos contra brucelas lisas na prova de aglutinação, dois homens eram fumantes. Um deles e a mulher tinham o hábito de roer unhas.

Tabela 4. Trabalhadores da granja de suínos, de acordo com sexo, idade, tipo de contato com os fetos abortados das matrizes naturalmente infectadas, resultado do teste de aglutinação no diagnóstico de brucelose suína e manifestação de sinais clínicos. Jaboticabal, 2006.

Trabalhadores da granja	Sexo	Idade	Contato direto com os fetos abortados	Teste sorológico	Sinais clínicos
1	Homem	50	Não	Negativo	Não
2	Homem	40	Não	Negativo	Não
3	Mulher	45	Não	Negativo	Não
4	Homem	27	Não	Negativo	Não
5	Homem	23	Não	Negativo	Não
6	Homem	54	Não	Negativo	Não
7	Homem	49	Não	Negativo	Não
8	Mulher	26	Não	Negativo	Não
9	Mulher	26	Não	Negativo	Não
10	Homem	23	Não	Negativo	Não
11	Homem	18	Não	Negativo	Não
12	Mulher	39	Sim	Positivo	Sim
13	Homem	27	Sim	Positivo	Não
14	Homem	25	Sim	Positivo	Não

Em novembro de 2006, foi efetuado por completo o abate sanitário das matrizes infectadas em um frigorífico do Estado de São Paulo. Após a retirada dos animais da granja, foi providenciada a remoção de todos os pisos de plástico da maternidade e os de cimento da instalação das matrizes infectadas, iniciando a limpeza com água e detergente apropriado para piso, com a utilização de escovões para a remoção dos resíduos. Em seguida foi feita a aplicação de cloro, deixando agir por 3 horas, antes do enxague. Esse processo foi repetido 3 vezes, com intervalos de 2 dias. Após essa etapa, foi utilizado lança-chamas, por 3 dias consecutivos.

Um novo processo de desinfecção foi realizado com detergente ácido, na dosagem de 200 mL para 20 L de água, deixando agir por 45 minutos, e após o enxágue aplicou-se um desinfetante à base de fenóis sintéticos, na dosagem de 150 mL para 20 L de água, deixando agir sem efetuar o enxágue da instalação até o dia seguinte. Essa etapa foi repetida durante 30 dias consecutivos. A mesma conduta foi adotada nas instalações da creche e da terminação. A granja continuava, até o momento em que este texto foi escrito, sem animais e sem previsão de retorno às atividades, estando, portanto, em vazio sanitário completo por tempo indeterminado.

2.5 DISCUSSÃO

Quando a brucelose é introduzida em um rebanho previamente saudável, os sintomas geralmente apresentados são: abortamento, infertilidade, nascimento de leitões fracos, orquite, epididimite (ACHA & SZYFRES, 2001); e manifestações clínicas de artrite e espondilite associadas com a paralisia dos membros posteriores são observadas ocasionalmente (DEYOE, 1986). Essas observações são compatíveis com os sinais clínicos nos suínos naturalmente infectados do presente estudo, pois 99 porcas deste rebanho abortaram, 35 apresentaram descarga vaginal, e 3, paralisia de membros posteriores.

Uma das seis matrizes necropsiadas na fazenda apresentava diversos abscessos esplênicos. ACHA & SZYFRES (2001) mencionam que abscessos de diferentes tamanhos ocorrerem em órgãos e tecidos de suínos infectados, entretanto DEYOE (1986) afirma que raramente a *B.suis* produz lesões significativas no baço. Em relação às aderências de intestino delgado encontradas em uma das porcas necropsiadas, não há relatos na literatura relacionando esse achado anatomopatológico com a infecção por *B.suis* ou qualquer outra espécie de brucela.

Como maioria das matrizes suínas foi positiva nos testes sorológicos e muitas delas demonstraram os sintomas clínicos da brucelose, pode-se então considerar a probabilidade de que todas as fêmeas adultas do plantel estivessem infectadas, isso porque suínos infectados podem produzir pouco ou não produzir anticorpos contra *Brucella*. Algumas cepas de *B.suis* aparentemente não estimulam a produção de anticorpos tão bem quanto outras (MACMILLAN, 1999). Por esses motivos, os testes sorológicos não possuem valor absoluto no diagnóstico individual, apesar de possuírem muito valor no diagnóstico de rebanho. Essas observações concordam com LORD et al. (1997) que observaram prevalência de 89% em uma granja suína na Venezuela e afirmaram que, considerando a extensão da brucelose na granja suína, é provável que todos os suínos estavam infectados, e com STOFFREGEN et al. (2007), que, estudando uma infecção enzoótica em suínos selvagens, mostraram que a soroprevalência

pode ser significativamente mais baixa do que a condição verdadeira do rebanho infectado.

Os suínos de todas as idades podem adquirir a infecção; no entanto, a literatura descreve maior prevalência da infecção em suínos adultos, principalmente em suinocultura intensiva, situação em que a disseminação é muito rápida (ALTON, 1990). Entretanto a infecção natural na propriedade no Município de Jaboticabal também estava difundida entre os animais novos. Dos 62 animais da terminação testados sorologicamente, 30,6% foram positivos no AAT e 27,4% positivos na RFC, concordando com a observação, feita por ALTON (1990), de que a maior prevalência em adultos, aparentemente, está relacionada ao maior risco de exposição e não necessariamente à idade.

DEYOE (1986) relata que a *B.suis* é a única espécie do gênero *Brucella* que reconhecidamente causa infecção sistêmica ou generalizada, provocando problemas reprodutivos nos suínos. A infecção por *Brucella* dentro da granja no Município de Jaboticabal foi confirmada pelo isolamento de um organismo identificado como *B.suis* biovar 1, e as características clínicas e epidemiológicas observadas no rebanho foram condizentes com a infecção por essa espécie de *Brucella*. O biovar 1 encontrado está de acordo com outros trabalhos, pois é esse o único biovar já confirmado na América Latina (CALDAS et al., 1963; GARCIA-CARRILLO et al., 1972; POESTER, 1978; ACHA & SZYFRES, 2001), e toda a evidência disponível indica que outras espécies da *Brucella* não são altamente patogênicas para suínos, e a infecção é autolimitante. DEYOE (1986) relata que suínos podem ser infectados natural ou experimentalmente com outras espécies de *Brucella*, mas, geralmente, a infecção persiste por menos de 60 dias e localiza-se nos gânglios regionais da porta de entrada.

No que diz respeito a outras espécies domésticas, a infecção por *B.suis*, particularmente, ocorre através do trato gastroentérico, em bovinos e equinos, especialmente quando essas espécies compartilham o mesmo pasto com suínos infectados (EWALT et al., 1997). Os bovinos, equinos, ovinos e gansos da granja estudada alimentavam-se em pastos que eram irrigados com dejetos das matrizes infectadas, sem receber nenhum tratamento prévio. LUSHSINGER et al. (1965)

descrevem a capacidade de sobrevivência da *B.suis* no ambiente como um fator relativamente importante na transmissão da doença. Apesar disso, a infecção por *Brucella* não foi demonstrada nesses animais, que foram negativos no AAT, mas 3 dos 13 cães da fazenda, que tinham acesso aos fetos suínos, foram positivos, concordando com os resultados de LORD et al. (1997), que observaram que quatro cães em uma granja suína infectada na Venezuela foram soropositivos para *Brucella*.

Dos 3 cães com títulos de anticorpos contra brucelas lisas, um macho apresentava orquite, e outro, dermatite escrotal, mas na fêmea não foi observado nenhum tipo de manifestação clínica. Eles tinham acesso à instalação das matrizes infectadas e contato direto com os fetos suínos abortados. ACHA & SZYFRES (2001) mencionam que cães adquirem a infecção primeiramente por ingerir material contaminado, especialmente fetos, envoltórios fetais e leite, e a infecção frequentemente ocorre de forma subclínica, mas às vezes os sinais clínicos podem ser severos, com febre, edema, orquite, anestro, artrite e ocasionalmente aborto, e CARMICHAEL & KENNEY (1970) descrevem a dermatite escrotal provocada por lambedura frequente devida à dor e à sensibilidade do quadro de epididimite que a brucela pode estabelecer no cão.

A brucelose humana pode ser considerada uma doença ocupacional, uma vez que profissionais que trabalham em contato direto com animais têm maior risco de contrair a doença, além da exposição ao material resultante de abortamento e secreções de animais infectados, que são a forma mais importante de contágio (MAHAJAN et al., 1986). A presença de títulos de anticorpos e sintomatologia clínica em alguns dos trabalhadores da granja mostra a ocorrência da infecção nas pessoas que tinham contato direto com as matrizes infectadas e fetos abortados infectados pela *B.suis*. NICOLETTI (1969) comenta que há relação direta entre a faixa de prevalência de brucelose nos rebanhos animais e a incidência da infecção humana nas granjas suínas, e LORD et al. (1997) relatam que 9 entre 10 trabalhadores em uma granja de suínos infectados na Venezuela estavam infectados. Diante deste cenário, cabe ao médico veterinário orientar o

pessoal envolvido com o manejo de animais, para evitar contato direto com placentas ou fetos abortados, pois trata-se de uma importante antropozoonose.

A principal fonte de infecção de *B.suis* é o suíno. Além dele, há poucos reservatórios conhecidos. A lebre europeia é responsável por surtos periódicos de brucelose na Europa (MACMILLAN, 1999). Também os porcos selvagens podem ser reservatórios da *B.suis*. (ZYGMONT et al., 1982), mas a influência desses suínos silvestres na epizootiologia da brucelose suína depende do tipo de contato que eles possam ter com os suínos domésticos (DEYOE, 1986). Isso significa que a transmissão é mais difícil quando o rebanho suíno é criado de forma intensiva. Há também relato de isolamento de *B.suis* de capivaras, na Venezuela (LORD & FLORES, 1983), porém o papel desse animal como reservatório não está devidamente caracterizado.

Na região do Município de Jaboticabal, não há relatos da presença de suínos selvagens, e os animais dessa granja estavam confinados, dificultando o acesso de qualquer outra espécie animal selvagem que pudesse servir de fonte de infecção para as matrizes em questão. Desta forma, acredita-se que seja possível que a bactéria tenha chegado à propriedade estudada por meio da compra de matrizes infectadas. Os 2 rufiões existentes na propriedade, abatidos e enterrados antes do início da pesquisa sorológica e bacteriológica, e que não eram utilizados para a reprodução, não permaneciam nas mesmas instalações das matrizes. Por isso, é improvável que tenha ocorrido transmissão por meio de secreções e excreções no momento em que eram utilizados para detecção do cio das matrizes para a realização da inseminação artificial, mesmo que estivessem infectados. Além disso, o sêmen utilizado para inseminação artificial teve resultado negativo para o cultivo de brucela, e o exame sorológico dos animais doadores de sêmen não demonstrou presença de anticorpos. Infelizmente não foi possível examinar os rebanhos fornecedores de matrizes, porque os responsáveis não permitiram o acesso, alegando possuir Certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos, em conformidade com a Instrução Normativa nº 19, de 19/02/2002.

As informações deste artigo indicam que, apesar da redução da prevalência da brucelose dos suínos no Brasil, a infecção por *B.suis* ainda ocorre,

colocando em risco a saúde animal e a humana, e que, devido às implicações da brucelose dos suínos para a saúde pública, as ações sanitárias não devem ser interrompidas, porque o agente etiológico ainda não foi erradicado em nosso país.

2.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na investigação permitem concluir que:

- O episódio ocorrido no Município de Jaboticabal foi diagnosticado como brucelose suína, tanto pela identificação do agente etiológico quanto pela sorologia;
- A brucelose estava disseminada por todo o rebanho, atingindo, além das matrizes, parte dos animais da terminação;
- Foi possível evidenciar a transmissão natural do agente etiológico para os cães, mas não para as outras espécies animais;
- Houve transmissão natural do agente etiológico para o ser humano, uma vez que três pessoas que tiveram contato com os animais infectados apresentaram títulos de anticorpos, e uma delas apresentou sintomas da enfermidade;
- Não foi possível elucidar com segurança a origem, porém o mais provável é que a infecção tenha chegado com a introdução de matrizes infectadas de outro rebanho.

2.7 REFERÊNCIAS*

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. v.1. Bacteriosis y Micosis. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p.28-56, 2001.

ALTON, G.G. *Brucella suis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, CRC Press, p.411-422, 1990.

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.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2000. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v.30, p. 39-50, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 6, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004. Seção 1, p. 6-10.

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

BUSCH L.A.; PARKER R.L. Brucellosis in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.125, n.289-294, 1972.

CALDAS, A.D.; OLIVEIRA Jr., B.S.; CASTRO, A.F.P., Tipificação de amostras de *Brucella suis* isoladas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.30, p.153-157, 1963.

CARMICHAEL, L.E.; KENNEY, R.M. Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.156, p.1726-1734, 1970.

DEYOE, B.L. Brucellosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 6th ed. Iowa State University Press: Ames, p.599-607, 1986.

* De acordo com as normas da ABNT-NR 6023

EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; RHYAN, J.C.; GEER, P.L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, p.417-420, 1997.

GARCIA-CARRILLO, C. Situación de la brucelosis en los animales domesticos de America Latina y su relación con la infección humana. **Higiene Alimentar**, v.2, n.3, p.92-101, 1983.

GARCIA-CARRILLO, C.G.; SZYFRES, B.; GONZÁLEZ TOMÉ, J. Tipificación de brucelas aisladas del hombre y los animales en America Latina. **Revista Latino-Americana de Microbiological**, v.14, p.117-125, 1972.

LORD, V.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELENDEZ, G. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.1, p.295-297, 1997.

LORD, V.R.; FLORES, R. *Brucella* spp. from the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: serologic studies and metabolic characterization of isolates. **Journal of Wildlife Diseases**, v.19, n.4, p.308-314, 1983.

LUSHSINGER, D.W.; ANDERSON, R.K., WERRING, D.F. A swine brucellosis epizootic. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n.147, p.632-636, 1965.

MACMILLAN, A.P. *Brucellosis*. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press: Ames, p. 385-393, 1999.

MAHAJAN, N.K.; KULSHRESTHA, R.C.; VASUDEVAN, B. Brucellosis – cause of abortion in sheep and its public health significance. **International Journal of Zoonoses**, v.13, n.3, p.174-179, 1986.

MATYAS, Z.; FUJIKURA, T. Brucellosis as a world problem. **Developments in Biological Standardization**, v.56, p.3-20, 1984.

MIRANDA, J.C.B.; SEI, V.L.B.; GIORGI, W.; SANDOVAL, L.A.; TERUYA, J.M. Isolamento de *Brucella suis* em um rebanho suíno infectado, associado à contaminação canina e humana. **Biológico**, v.44, n.9, p.205-210, 1978.

MORÉS N.; ZANELLA J.C. **Perfil sanitário da suinocultura no Brasil**. Agrosoft Brasil, 2006, 3 p. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/18924.htm>> Acesso em: 19 de março de 2010.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, p.1811-1816, 1969.

POESTER, F.P. Isolamento de *Brucella abortus* e *suis* respectivamente em bovinos e suínos do RS e SC. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.5, p.27-31, 1978.

SILVA, J.A; VIANA, F.C.; MODENA, C.M.; FERREIRA, J.N.S. Prevalência da brucelose suína de granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n.4, p. 433-442, 1984.

STOFFREGEN, W.C.; OLSEN, S.C.; WHEELER, C.J.; BRICKER, B.J.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.E.; HALLING, S.M.; ALT, D.P. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.227-237, 2007.

TAYLOR J.P.; PERDUE J.N. The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1977-1986. **American Journal of Epidemiology**, v.130 p.160-165. 1989.

ZYGMONT, S.M.; NETTLES, V.F.; SHOTTS, E.B.; CARMEN, W.A.; BLACKBURN, B.O. Brucellosis in wild swine: a serologic and bacteriologic survey in the southeastern United States and Hawaii. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.181, n.11, p.1285-1287, 1982.

CAPÍTULO 3 – LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE BRUCELOSE SUÍNA EM ANIMAIS ABATIDOS E TRABALHADORES EM UM FRIGORÍFICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO – Estudos revelam que os trabalhadores de frigoríficos estão sujeitos ao risco da infecção por *Brucella*. O presente estudo foi realizado com o objetivo de verificar a frequência de anticorpos contra brucelas lisas em suínos provenientes de granjas dos municípios de Bauru-SP, Neves Paulista-SP, Macauba-SP e Arapoti-PR abatidos em um frigorífico do Estado de São Paulo que abastece o mercado consumidor de Ribeirão Preto-SP, São José do Rio Preto-SP e região desses dois municípios. Um total de 1.100 amostras de soro sanguíneo de suínos foi colhido no momento da sangria, após dessensibilização. Desses animais, 8 (0,73%) foram positivos no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), mas nenhum deles teve esse resultado confirmado nos testes confirmatórios: combinação das provas de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), e reação de fixação de complemento (RFC). Os 24 funcionários do frigorífico foram submetidos a provas sorológicas, e nenhum deles apresentou títulos de anticorpos. Concluiu-se que a brucelose não representa problema sanitário importante nos rebanhos estudados e que a carne comercializada por esse frigorífico em Ribeirão Preto, São José do Rio Preto e região não representou riscos à saúde da população, nem à saúde dos funcionários que ali trabalhavam.

Palavras-chave: Brucelose, frigorífico, suínos, zoonose

SEROLOGICAL INVESTIGATION OF BRUCELLOSIS IN SWINE SLAUGHTERED AND IN WORKERS IN AN ABATTOIR IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

SUMMARY – Previous studies have shown that slaughterhouse workers are under the risk of *Brucella* infection. This study was carried out to verify the frequency of antibody to smooth *Brucella* in pigs from farms in the municipalities of Bauru, Neves Paulista and Macaubal, state of São Paulo, and Arapoti, state of Paraná, slaughtered in an abattoir that supplies the consuming market of Ribeirão Preto, São José do Rio Preto and region, in the state of São Paulo. Blood samples from 1,100 pigs were collected at the moment of bleeding, after desensitization of the animals. Eight (0.73%) samples tested positive in Rose Bengal test (RBT), but none of them had this result confirmed by 2-mercaptoethanol plus standard tube agglutination test (STAT+2-ME) or complement fixation test (CFT). All the 24 abattoir workers were tested by serological techniques, and none of them had antibody titers to smooth *Brucella*. The results showed that brucellosis did not represent an important sanitary problem in the studied herds, and that the meat commercialized by this slaughterhouse in Ribeirão Preto and São José do Rio Preto did not represent risk to the public health nor to the health of the workers.

Key Words: Brucellosis, slaughterhouse, swines, zoonosis

3.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A brucelose suína é uma doença de distribuição geográfica cosmopolita. Ocorre na maioria dos países onde se criam suínos. Os biovars 1 e 3 são os mais disseminados mundialmente, isolados na Europa, Ásia, Austrália e Ilhas do Pacífico (FRYE et al., 1991). O biovar 2 restringe-se à Europa, e o biovar 4, presente no Canadá, no Alaska e na Sibéria (FORBES, 1991; MACMILLAN, 1999). No Brasil, somente o biovar 1 já foi isolado (CALDAS et al., 1963; POESTER, 1978; ACHA; SZYFRES, 2001).

Os dados sobre a ocorrência da brucelose suína no Brasil são bastante escassos, decrescendo sua prevalência de 2,19% em um levantamento feito em 1981 (GARCIA-CARRILLO, 1983) para 0,34% nos últimos levantamentos (BRASIL, 2000). Dados apresentados por GARCIA-CARRILLO (1983) demonstraram que a prevalência estimada da brucelose suína no Brasil varia conforme a região, sendo desconhecida em boa parte do país.

A brucelose suína possui notável importância em saúde pública. De acordo com Fox & Kaufmann (1977), a maioria dos casos de brucelose humana nos EUA é causada pela *Brucella suis*. A maior importância dessa espécie em relação aos outros microrganismos desse gênero poderia ser atribuída principalmente a dois fatores: a *B.suis* parece possuir maior patogenicidade para o homem que as outras brucelas, com exceção da *B.melitensis*, e os suínos infectados tendem a possuir maior quantidade de bactérias nos tecidos que bovinos infectados com *B.abortus* (MACMILLAN, 1999).

O ser humano ou animais domésticos em contato com carcaças contaminadas de suínos infectados ou, ainda, alimentados com carne suína crua ou mal cozida podem se infectar com *B.suis*, embora na maioria desses casos a infecção seja assintomática (ALTON, 1990).

Os biovars 1 e 3 da *B.suis* são de alta patogenicidade para o homem, constituindo um risco ocupacional para trabalhadores de abatedouros, açougueiros e veterinários. Os abatedouros são ambientes propícios para a

ocorrência de infecção ocupacional, uma vez que, além de os operários trabalharem em contato direto com as carcaças, o ambiente do abatedouro favorece a formação de grande quantidade de aerossóis, que podem potencialmente transmitir o agente. Essas condições resultam em frequente exposição dos trabalhadores de abatedouros ao agente, particularmente em áreas endêmicas (BARBUDDHE et al., 2000). Em 1992, foram relatados 18 casos de brucelose em trabalhadores de um frigorífico suíno no Estado da Carolina do Norte, nos EUA, o que demonstra o risco de contrair brucelose causada por *B.suis* (TROUT et al., 1995).

Há também relatos de casos de infecção de indivíduos que trabalhavam com empacotamento de carnes, o que pode ter importância em nosso meio (LANDAU & GREEN, 1999 apud SANTOS et al., 2005). Em um estudo no Brasil, FREITAS et al. (2001) demonstraram o risco de brucelose zoonótica associada a suínos de abate clandestino. Os autores observaram que, de 139 amostras de soro de animais de diversas procedências do Estado do Pará, submetidos ao diagnóstico sorológico por *card test* e soraglutinação rápida, 54 (42,2%) apresentaram anticorpos para *Brucella* sp e títulos aglutinantes assim distribuídos: 16 (11,5%) com título de 1:50; 27 (17,0%) com títulos de 1:100; 8 (5,7%) com títulos 1:200 e 11 (7,7%) com títulos 1:400, demonstrando o elevado risco sanitário para pessoas no abate e para os consumidores. Por isso, a brucelose causada por *B.suis* pode ter importância em saúde pública, devido ao risco de consumo de carne suína contaminada e o perigo de infecção das pessoas que a manipulam (FREITAS et al., 2001).

Apesar da importância da brucelose suína, não existe muita informação atualizada sobre a situação epidemiológica no Brasil. Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de anticorpos contra *Brucella* em animais abatidos e nos trabalhadores deste estabelecimento, contribuindo para o conhecimento da situação desta enfermidade no Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

- Verificar a ocorrência de brucelose em animais e o risco para humanos em um abatedouro de suínos no Estado de São Paulo.

3.2.2 Objetivos específicos

- Estudar a frequência de suínos reagentes contra amostras lisas de *Brucella* em animais abatidos em um frigorífico do Estado de São Paulo;
- Avaliar o risco de ocorrência de brucelose suína em trabalhadores de um frigorífico no Estado de São Paulo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Características do frigorífico

Os animais abatidos neste frigorífico eram provenientes de granjas dos municípios de Bauru-SP, Neves Paulista-SP, Macaúbal-SP e Arapoti-PR, a carne era distribuída para as cidades de Ribeirão Preto-SP, São José do Rio Preto-SP e região de ambos os municípios. Em média, eram abatidos 400 animais por dia. Quando chegavam ao frigorífico, os animais eram desembarcados e permaneciam em baias (Figura 1 Foto A) até o momento do abate, e então eram encaminhados por corredores até a instalação interna do frigorífico (Figura 1 Foto B).



Figura 1. Instalações para abate dos suínos em um frigorífico no Estado de São Paulo (2008-2010). Recepção (A). Corredor para as instalações internas do frigorífico (B). Dessensibilização por eletrochoque (C). Suspensão da carcaça (D). Carcaça em direção ao corredor da sangria (E). Colheita de sangue (F). Seção de sangria (G). Linha de abate após sangria (H).

3.3.2 Obtenção das amostras

Os suínos eram dessensibilizados por eletrochoque (Figura 7 Foto C e Foto D), suspensos e direcionados para o corredor da sangria (Figura 7 Foto E). Neste momento, o sangue era colhido (Figura 7 Foto F e Foto G) e então o animal seguia a linha de abate normalmente (Figura 7 Foto H). Foram colhidas 1.100 amostras de sangue suíno, machos e fêmeas adultos, durante o período de julho de 2008 a janeiro de 2010. As amostras eram colhidas e encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, onde eram armazenadas a uma temperatura de -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

Vinte e quatro funcionários desenvolviam as atividades do frigorífico, distribuídos nas seções da linha de abate (dessensibilização, sangria, esfolagem, oclusão de reto e retirada do casco, chamuscamento, evisceração, triparia, divisão da carcaça, e inspeção), armazenagem, embarque e transporte das carcaças. O soro sanguíneo colhido de todos esses profissionais foi submetido ao diagnóstico sorológico de brucelose.

3.3.3 Técnicas laboratoriais

3.3.3.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e “card test”, foi realizado conforme a técnica recomendada no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.1 do Capítulo 2.

3.3.3.2 Teste do 2-mercaptoetanol (ME)

Essa técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.2 do Capítulo 2.

3.3.3.3 Teste de soroaglutinação lenta (SAL)

Também chamada de teste de soroaglutinação em tubos (SAT), essa prova é utilizada em associação com o teste do ME para confirmar resultados positivos na prova de triagem. A técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.3 do Capítulo 2.

3.3.3.4 Reação de fixação de complemento (RFC)

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988), realizada conforme descrita no item 2.3.3.4 do Capítulo 2.

3.4 RESULTADOS

Das 1.100 amostras de soro sanguíneo dos suínos colhidas no frigorífico, 8 (0,73%) foram positivas no teste do AAT, mas nenhuma delas teve o resultado confirmado nos testes confirmatórios: SAL+ME e na RFC (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo de suínos colhidas em um frigorífico no Estado de São Paulo, 2008-2010.

Testes Sorológicos	Positivo		Negativo		Total
	Número	%	Número	%	
AAT	8	0,73	1.092	99,3	1.100
SAL+ME	0	0	1.100	100	1.100
RFC	0	0	1.100	100	1.100

Dos 24 funcionários do frigorífico submetidos a exame sorológico para o diagnóstico de brucelose, nenhum apresentou títulos de anticorpos contra brucelas lisas nas provas sorológicas usadas no diagnóstico da brucelose (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Resultados dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação de soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC) nas amostras de soro sanguíneo colhidas de funcionários de um frigorífico no Estado de São Paulo, 2010.

Testes Sorológicos	Positivo		Negativo		Total
	Número	%	Número	%	
AAT	0	0	24	100	24
SAL+ME	0	0	24	100	24
RFC	0	0	24	100	24

Tabela 3. Trabalhadores do frigorífico do Estado de São Paulo, Brasil (2010), de acordo com sexo, tipo de atividade e resultado da sorologia para diagnóstico de brucelose suína.

Trabalhadores do frigorífico	Sexo	Tipo de atividade	Resultado da sorologia
1	Homem	Dessensibilização e sangria	Negativo
2	Homem	Dessensibilização e sangria	Negativo
3	Homem	Esfola	Negativo
4	Homem	Oclusão de reto/ retirada do casco	Negativo
5	Homem	Oclusão de reto/ retirada do casco	Negativo
6	Homem	Oclusão de reto/ retirada do casco	Negativo
7	Homem	Chamuscamento	Negativo
8	Homem	Evisceração	Negativo
9	Homem	Evisceração	Negativo
10	Homem	Divisão da carcaça	Negativo
11	Homem	Inspeção	Negativo
12	Mulher	Tripária	Negativo
13	Mulher	Tripária	Negativo
14	Homem	Tripária	Negativo
15	Homem	Tripária	Negativo
16	Homem	Tripária	Negativo
17	Homem	Tripária	Negativo
18	Homem	Armazenagem e embarque	Negativo
19	Homem	Armazenagem e embarque	Negativo
20	Homem	Armazenagem e embarque	Negativo
21	Homem	Armazenagem e embarque	Negativo
22	Homem	Armazenagem, embarque e transporte	Negativo
23	Homem	Armazenagem, embarque e transporte	Negativo
24	Homem	Armazenagem, embarque e transporte	Negativo

3.5 DISCUSSÃO

Os testes sorológicos não possuem valor absoluto no diagnóstico individual de brucelose suína, apesar de possuírem muito valor no diagnóstico de rebanhos. Portanto, as informações epidemiológicas e um adequado histórico do rebanho representam auxílios muito importantes no diagnóstico.

Comparando-se os resultados observados no presente estudo àqueles relatados na literatura especializada nas últimas décadas, nota-se uma queda na frequência de reagentes em suínos abatidos em frigoríficos de nosso país. Na década de 1930, Penha e Pacheco (1934) isolaram de suínos, no Estado de São Paulo, amostras de *Brucella suis*, sendo essas as primeiras constatações de brucelose suína no Brasil. Ainda no ano de 1934, Cícero Neiva encontrou um total de 44,04% de suínos soropositivos abatidos em matadouros, e no ano de 1936, Pecego e colaboradores verificaram 46,83% de aglutinações positivas (COSTA et al., 1971).

Na década de 1940, Alice, na Bahia, examinou 116 amostras de sangue de suínos abatidos no Matadouro da Capital do Estado, em Salvador, e encontrou 36 (31,03%) animais reagentes, e Mosci (1949), no Estado do Rio de Janeiro, relatou 37 (11,97%) soropositivos. Silva, no Estado Rio Grande do Sul, Cunha Bifone, no Estado de São Paulo, Costa, no Estado de Alagoas, e Hipólito, no Estado de Minas Gerais, examinaram soros de suínos, em número relativamente pequeno, variando de 70 a 200 animais nos diversos trabalhos, e encontraram reagentes positivos em percentuais de 37,7%, 33,5%, 31,66% e 47,5% respectivamente (COSTA et al., 1971).

Na década de 1950, Valle (1953) verificou 23,2% de animais positivos no Estado de São Paulo, 3,6% no Estado de Rio Grande do Sul, 8,9% no Estado de Santa Catarina e 27,3% no Estado do Paraná. Pacheco e Mello, em 1955, encontraram um percentual de 30 a 40% de brucelose entre suínos no Brasil (COSTA et al., 1971).

Schlogel, no Paraná, em 1965, após realizar 25.183 provas com amostras de sangue de suínos, constatou um percentual de 27,14% de reagentes positivos, consequentemente bastante elevado (COSTA et al., 1971).

Atualmente, o desenvolvimento da indústria suína exige um ótimo estado sanitário, e essa é uma das razões por que certas doenças como a brucelose suína têm sido eliminadas nas granjas tecnificadas. As 1.100 amostras de suínos colhidas no frigorífico eram provenientes de granjas tecnificadas, com condições mínimas de exigências sanitárias, inclusive adquirindo reprodutores e matrizes de rebanhos livres da infecção, o que pode explicar o resultado negativo nas provas confirmatórias (SAL+ME e na RFC) das 1.100 amostras colhidas. Assim, dentro da amostra estudada, foram encontrados 8 (0,73%) animais soropositivos no AAT e 1.092 (99,27%) soronegativos nesse teste.

Dados apresentados por GARCIA-CARRILLO (1983) demonstraram que a prevalência estimada da brucelose suína no Brasil varia conforme a região, sendo desconhecida em boa parte do país. VIANA (1979) e FIGUEIREDO (1985), no Estado de Minas Gerais, MOTA et al. (1997), no Estado de Pernambuco, e MATOS et al. (2004), no Estado de Goiás, observaram prevalências de 13,0%, 8,7%, 60,0% e 4,5% respectivamente. Observando os resultados de prevalência relatados, verifica-se que a ocorrência de animais soropositivos no presente estudo é muito menor. Entretanto, nos relatos de SILVA et al. (1984), POESTER (1989) e POESTER et al. (2002), foi mencionada, respectivamente, prevalência de 0,65%, 0,2% e 0,34%, valores mais próximos dos encontrados no presente estudo (0,73%).

Embora seja referenciada na literatura a importância da brucelose como risco ocupacional para trabalhadores de frigoríficos, pois se trata de ambientes que favorecem a formação de grande quantidade de aerossóis que podem potencialmente transmitir o agente desta enfermidade, além de os operários trabalharem em contato direto com as carcaças, secreções e excreções (BARBUDDHE et al., 2000), não foi detectada a presença de anticorpos contra brucelas lisas no soro sanguíneo dos trabalhadores desse estabelecimento. O resultado encontrado neste trabalho também foi diferente dos resultados

apresentados por TROUT *et al.* (1995), que em 1992 observaram 18 casos de brucelose em trabalhadores de um frigorífico suíno no Estado da Carolina Norte, nos EUA.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no período de realização deste estudo permitem concluir que:

- Não foram encontrados suínos reagentes contra amostras lisas de *Brucella* entre os animais abatidos no frigorífico estudado;
- Não ficou caracterizado o risco de exposição dos trabalhadores à brucelose suína.

3.7 REFERÊNCIAS*

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. v.1. Bacteriosis y Micosis. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, p.28-56, 2001.

ALTON, G.G. *Brucella suis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, CRC Press, p.411-422, 1990.

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. 190p.

BARBUDDHE, S.B.; KUMAR, P.; MALIKA, S.V.; SINGH, D.K.; GUPTA, L.K. Seropositivty for intracellular bacterial infections among abattoir associated personnels. **Journal of Communicable Diseases**, v.32, n.4, p.295-299, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, v.30, p. 39-50, 2000.

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

CALDAS, A.D.; OLIVEIRA Jr., B.S.; CASTRO, A.F.P. Tipificação de amostras de *Brucella suis* isoladas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.30, p. 153-157, 1963.

COSTA, M.D.M.; DORIA, J.D.; MARTINEZ, T.C.N.; TEXEIRA, E.M.L. Contribuindo ao estudo da bucelose suína na Bahia. **Instituto Biológico da Bahia**, v.10, n.1, p.1-8, 1971.

FIGUEIREDO, B.L. Brucelose como doença ocupacional. I. Aglutininas anti-*Brucella* sp. em grupos ocupacionais dos frigoríficos da grande Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, p.385-407, 1985.

FORBES, L.B. Isolates of *Brucella suis* biovar 4 from animals and humans in Canadá, 1982-1990. **Canadian Veterinary Journal**, v.32, p.686-688, 1991.

FREITAS, J.A.; GLINDO, G.A.R.; SANTOS, E.J.C.; SARRAF, K.A.; OLIVEIRA, J.P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.1, p.101-102, 2001.

* De acordo com as normas da ABNT-NR 6023

FRYE, G.H.; GILSDORF, M.J.; LENARD, D. Cooperative State Federal Brucellosis Eradication Program. **Proceedings of the 95th Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.97, p.138-154, 1991.

GARCIA-CARRILLO, C. Situación de la brucelosis en los animales domesticos de America Latina y su relación con la infección humana. **Higiene Alimentar**, v.2, n.3, p.92-101, 1983.

MACMILLAN, A.P. *Brucellosis*. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press: Ames, p. 385-393, 1999.

MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J; PÔRTO, R.N.G; MEIRINHOS, M.L.G. Ocorrência de anticorpos para *Brucella* sp. em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p.105-108, 2004.

MOTA, R.A.; BARROS, M.A.S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Impacto da brucelose suína na produtividade de rebanho na Região Metropolitana do Recife. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Anais...** Gramado – RS, 1997. 308p.

POESTER, F.P. Isolamento de *Brucella abortus* e *suis* respectivamente em bovinos e suínos do RS e SC. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.5, p.27-31, 1978.

POESTER, F.P. Brucelose suína em rebanhos de alto valor zootécnico no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, v.1, n.100, p. 28-35, 1989.

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

SANTOS, R. L.; SILVA, F.L.; PAIXÃO, T.A.; SAMARTINO, L.E. Brucelose suína. In: **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, CRMV-MG**, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Vetrinária e Zootecnia - FEP-MVZ Editora, n.47, 2005.

SILVA, J.A.; VIANA, F.C.; MODENA, C.M.; et al. Prevalência da brucelose em suínos de granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.36, v.6, 1984.

TROUT, D.; GÓMEZ, T.M.; BERNARD, B.P.; MUELLER, C.A.; SMITH, C.G.; HUNTER, L.; KIEFER, M. Outbreak of brucellosis at a United States pork packing plant. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v.37, p.697-703, 1995.

VIANA, F.C. Brucelose suína: Prevalência em suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte e comparação da soro-aglutinação com outros métodos sorológicos. **Arquivos da Escola Veterinária da UFMG**. v.31, n.3, p.490,1979.

CAPÍTULO 4 – COMPARAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUÍNA

RESUMO – Os objetivos deste trabalho foram avaliar o desempenho do teste do antígeno acidificado tamponado após tratamento dos soros com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF) como técnicas para o diagnóstico sorológico da brucelose suína e avaliar as técnicas sorológicas antígeno acidificado tamponado (AAT), combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), preconizadas pela legislação brasileira, estimando a sensibilidade e a especificidade de cada uma. Foram analisadas 333 amostras de soro de suínos de um rebanho comprovadamente infectado, de forma natural, por *Brucella suis* e 1.100 amostras de suínos de rebanhos livres da infecção, obtidas em um frigorífico. Dependendo da condição considerada, a sensibilidade do TPF variou de 95,94% a 96,05%, e a do AAT-RIV, de 79,7% a 82,79%. Já a especificidade do TPF variou de 98,0% a 99,54%, e a do AAT-RIV foi de 100%. Adotando-se um ponto de corte fixo de 85,9 mP no TPF, a sensibilidade e a especificidade relativas encontradas foram de 98,9% e 98,6%, respectivamente. O AAT apresentou soma dos valores de sensibilidade e especificidade superior à da RFC e à do SAL+ME. Todos os testes apresentaram concordância ótima entre si. A maior concordância foi observada entre RFC e SAL+ME ($\kappa = 0,98$), e a menor, entre TPF e AAT-RIV ($\kappa = 0,87$).

Palavras-chave: Brucelose suína, concordância, especificidade, sensibilidade, sorologia

COMPARISON OF SEROLOGICAL TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF SWINE BRUCELLOSIS

SUMMARY – The aim of this investigation was to evaluate the performance of the rose Bengal plate test after treatment of the serum with rivanol (RBPT-RIV) and of the fluorescence polarization assay (FPA) for the serological diagnosis of swine brucellosis, and compare them with the techniques recommended by Brazilian rules: rose Bengal (RBPT), complement fixation (CFT) and a combination of standard agglutination and 2-mercaptoethanol tests (SAT+ME). Serum samples of 333 animals from a *Brucella suis* infected swine herd and 1,100 serum samples from pig herds free of infection collected at an slaughterhouse were analyzed. Sensitivity of the FPA ranged from 95.94% to 96.05%, and sensitivity of the RBPT-RIV ranged from 79.7% to 82.79%, depending on the condition. Specificity of the FPA ranged from 98.0% to 99.54%, and specificity of the RBPT-RIV was 100%. Adopting for the FPA a cut-off settled in 85.9 mP, the relative sensitivity and specificity was 98.9% and 98.6%, respectively. The RBPT had a combined value of sensitivity and specificity higher than did the CFT and the SAT+ME. Agreement among the tests was excellent. The highest agreement was observed between CFT and SAT+ME ($\kappa = 0.98$), and the lowest was observed between FPA and RBPT-RIV ($\kappa = 0.87$).

Key Words: Swine brucellosis, agreement, specificity, sensitivity, serology

4.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O diagnóstico é parte essencial de um programa sanitário. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico baseia-se nos sinais; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, em exames complementares diretos e indiretos (PAULIN & FERREIRA, 2003).

Na brucelose animal, assim como em outras infecções, o isolamento do microrganismo é o método diagnóstico mais seguro, mas, em virtude das dificuldades desse procedimento e da sua limitação para o uso em grandes rebanhos, os métodos sorológicos são os mais utilizados (DEYOE, 1969; HUBER & NICOLETTI, 1986; ROGERS et al., 1989; ALTON, 1990; NICOLETTI & TANYA, 1993; ABIMERHI et al., 1998; MACMILLAN, 1999).

Deve-se, porém, levar em consideração que ao redor de 18% dos suínos saudáveis podem apresentar título aglutinante de 1:25 (DEYOE, 1969). Por outro lado, suínos infectados podem produzir pouco ou não produzir anticorpos contra *Brucella*. Algumas cepas de *B.suis* aparentemente não estimulam a produção de anticorpos tão bem quanto outras. Outra situação importante a ser considerada é a variação no estágio da doença em uma granja suína infectada. Suínos expostos a pequena dose infectante de *B.suis* geralmente apresentam um prolongado período de incubação antes de produzirem uma quantidade suficiente de anticorpos aglutinantes em sorologia (MACMILLAN, 1999).

O sucesso do controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. Os critérios adotados para a escolha de tais testes são custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença (CHAPPEL, 1989).

A sensibilidade e a especificidade são dois importantes critérios para a escolha de testes de diagnóstico a serem usados em programas sanitários. A sensibilidade é a habilidade de um teste em identificar um animal infectado, e a especificidade é a habilidade para designar seguramente os animais não infectados pelo agente em questão (HUBER & NICOLETTI, 1986). O ideal seria

utilizar um teste em que ambas as propriedades, sensibilidade e especificidade, fossem 100%. Na prática, isso raramente é possível, pois elas estão relacionadas de maneira inversa. A tentativa de melhorar a sensibilidade frequentemente resulta na piora de especificidade (PEREIRA, 2000).

No Brasil, o controle da brucelose em suínos consiste no reconhecimento de Granjas Reprodutoras de Suídeos Certificadas (GRSC). Para isso, devem ser realizadas provas sorológicas, com intervalo de seis meses, utilizando o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), e os soros que apresentarem positividade devem ser submetidos a provas confirmatórias, 2-mercaptoetanol realizado simultaneamente a soroaglutinação lenta (SAL+ME), ou reação de fixação de complemento (RFC). Na primeira vez que o rebanho é examinado, são testados todos os reprodutores e todas as matrizes. Nos monitoramentos posteriores, é feita uma amostragem, e o número de animais a serem testados depende do número de reprodutores suínos no plantel, considerando uma prevalência estimada de 5% e um nível de confiança de 95%. Os casos não previstos nesta Instrução Normativa são resolvidos pelo Departamento de Defesa Animal (BRASIL, 2002).

Os testes sorológicos para brucelose em suínos não possuem valor absoluto no diagnóstico individual, apesar de possuírem muito valor no diagnóstico de rebanhos (MACMILLAN, 1999). Quando o enfoque é o rebanho, o teste utilizado na triagem inicial deve ser barato, de fácil realização, rápido, altamente sensível, mesmo que a especificidade não seja tão alta (NIELSEN, 2002). Vários testes sorológicos têm sido projetados para atender esses requisitos. A maioria desses testes é baseada na aglutinação de antígenos por anticorpos específicos presentes no sangue de animais infectados (BRICKER, 2002). Os testes de aglutinação mensuram a concentração de imunoglobulinas (Ig) séricas e são sensíveis a diferentes isotipos de anticorpos (MITTAL & TIZARD, 1983).

De um modo geral, os testes sorológicos usados no diagnóstico da brucelose suína são os mesmos usados no diagnóstico da brucelose bovina, e muitos testes já foram avaliados para tal finalidade. Emprega-se como antígeno

suspensão de *B.abortus* 1.119/3, uma vez que a *B.abortus* possui na sua superfície o mesmo complexo de lipopolissacarídeos que a *B.suis* (MACMILLAN, 1999).

No início da década de 1960, visando obter um teste rápido e confiável, pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, com base nas observações de ROSE & ROEPKE (1957), de que a redução do pH do antígeno tornava o teste de soroaglutinação em placa mais específico, desenvolveram um teste usando antígeno de *Brucella abortus* corado com rosa de Bengala e tamponado com pH 3,65. Esse teste, que utilizava componentes descartáveis e podia ser realizado usando soro ou plasma, obtido com fito-hemaglutininas e anticoagulantes, ficou conhecido como “brucellosis card test”.

O AAT, técnica similar ao “card test”, consiste em uma soroaglutinação em placa, em que o antígeno, na concentração de 8% de volume celular, é tamponado em pH baixo (3,65) e corado com rosa de Bengala. Essa acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM, tornando a prova seletiva para a identificação de IgG1 (ALTON et al., 1988).

Devido a sua elevada sensibilidade, o AAT é bastante útil no diagnóstico da brucelose suína, embora reações falso-negativas e falso-positivas possam ocorrer e possa haver subjetividade na leitura da reação (ARAUJO et al., 2003).

A ocorrência de reações falso-negativas, ao permitir a manutenção de animais infectados no rebanho, pode comprometer o sucesso dos programas de controle e erradicação da enfermidade. A fim de evitar esse fato, alguns pesquisadores de países como Argentina, Venezuela e Estados Unidos vêm utilizando um antígeno acidificado em pH próximo ao do AAT, porém com uma concentração maior de brucelas, de 11% de volume celular. Esse teste, denominado *Buffered Plate Antigen (BPA)* apresenta vantagens similares às do AAT, sendo considerado uma prova eficiente para suínos (LORD et al., 1997). Essa situação foi observada por ARAUJO et al. (2003) no Brasil, em suínos oriundos de 18 granjas tecnificadas do Estado do Rio de Janeiro, os quais encontraram uma amostra positiva no BPA e negativa no AAT; esse animal apresentou título de 50 na SAL e 25 no ME, confirmando o resultado positivo.

Com o uso apenas do AAT, como a recomendação oficial, esse animal não teria sido identificado e poderia vir a constituir-se em uma fonte de infecção para o rebanho.

Devem-se levar em consideração também as reações cruzadas produzidas por diversos organismos, que incluem *Escherichia coli* sorogrupo O:157, *Salmonella* sorovar de Kaufman-White grupo N e, a mais importante, a infecção por *Yersinia enterocolitica* sorotipo 09, fato já constatado por grande número de pesquisadores, como por exemplo AKKERMANS & HILL (1972), que verificaram, por meio de infecção experimental em suínos, a ocorrência de reação cruzada entre infecção por *B.suis* e por *Y.enterocolitica* sorotipo 09.

Os suínos constituem importante reservatório para a *Y.enterocolitica*, e são frequentes os relatos de isolamento do sorotipo 09 a partir dessa espécie animal (BOCKEMUHL & ROTH, 1978). Embora no Brasil não haja registro desse isolamento, a infecção suína por *Y.enterocolitica* sorotipo 09 tem sido constatada em levantamentos sorológicos. FALCÃO et al. (1980), em inquérito sorológico realizado em rebanhos suínos de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, constataram 21,9% de reagentes positivos para *Y.enterocolitica*; 5,16% deviam-se a aglutinação com o sorotipo 09. Essa possibilidade de reação cruzada deve ser levada em consideração ao se realizar o diagnóstico sorológico da brucelose suína, uma vez que a mesma pode ser responsável pela ocorrência de resultados falso-positivos (MACMILLAN, 1999).

Visto que a sensibilidade é crucial na triagem inicial, a ocorrência de algumas amostras falso-positivas deve ser tolerada, para que possa ser detectado todo o animal infectado da propriedade (BRICKER, 2002). Assim, provas confirmatórias de maior especificidade devem ser realizadas para evitar o sacrifício de animais não infectados, porém geralmente elas são mais caras e laboriosas (NIELSEN, 2002).

No Brasil, os testes confirmatórios oficiais adotados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) são: a combinação das provas SAL + ME e a RFC (BRASIL, 2004a). Ambos os testes são trabalhosos e complexos, exigindo pessoal treinado e

laboratórios bem equipados (DAJER et al., 1999). Segundo a Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as mesmas técnicas do PNCEBT devem ser adotadas para o diagnóstico da brucelose em suínos (BRASIL, 2002).

A prova do 2-mercaptoetanol (ME) fundamenta-se na ação de certos compostos que contêm o radical tiol, que degrada a configuração em pentâmero da IgM, quebrando suas pontes dissulfeto e reduzindo-a a unidades monoméricas, determinando assim a perda de atividade aglutinante, tornando o teste sujeito apenas às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alteração na sua atividade, na presença desse reagente, aumentando a especificidade do teste (BERCOVICH, 1998).

Apesar de ser uma prova eficiente para bovinos (NICOLETTI, 1969; MARIÑO et al., 1991) e bubalinos (SHANDU & JOSHI, 1993; BERCOVICH, 1998; FOSGATE et al., 2002), NIELSEN (2002) indicou a possibilidade de ocorrência de resultado falso-negativo na prova do ME, em decorrência da presença de pontes dissulfeto também nas moléculas de IgG, e BERCOVICH (1998) alegou não ser uma prova adequada para a identificação de animais infectados recentemente. PÉREZ FRANCO & GARCIA-CARRILLO (1970) examinaram 1.525 soros de suínos abatidos em frigoríficos na cidade de Buenos Aires, Argentina, e obtiveram as seguintes porcentagens de positivos: SAL 6,5%, RFC 6,4% e ME 5,9%.

Além do mais, a prova do ME apresenta alguns inconvenientes, entre os quais podem ser mencionados o prolongado tempo de incubação, 48 horas, necessário para a obtenção do resultado; o fato de usar grandes volumes de reagentes, e portanto, a quantidade de reagentes necessária; o fato de ser bastante trabalhoso e, ainda, o fato de o 2-mercaptoetanol ser um agente cancerígeno, quando inalado, devendo ser usado somente em ambientes apropriados e bem ventilados (NIELSEN, 2002). Certos cuidados devem ser tomados com a substância 2-mercaptoetanol, que é extremamente sensível à luz e ao calor e se deteriora rapidamente por exposição ao ar, devendo por isso ser

conservada em frasco âmbar hermeticamente fechado e em refrigeração (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1982).

Deve-se destacar que a prova do ME, segundo o PNCEBT, deve ser realizada juntamente com a prova da soroaglutinação lenta (SAL), o que significa o dobro de desvantagem, pois, da mesma forma que a prova do ME, a prova de SAL requer o mesmo trabalho e grandes volumes de reagentes.

A RFC é um dos testes de referência recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de suínos (OIE, 2009) e tem sido utilizada com sucesso em muitos países nos programas de controle e erradicação (NIELSEN, 2002). Apesar de essa técnica detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1, principal imunoglobulina resultante da infecção por *B.abortus* em bovinos, é muito mais efetivo como fixador de complemento, e a IgM é parcialmente destruída durante o processo de inativação do complemento, o que torna a prova mais específica (ALTON et al., 1988).

Estudos realizados em bovinos infectados, natural ou experimentalmente, indicaram que a RFC apresenta boa correlação com o isolamento do agente etiológico (HAYES & CHAPPEL, 1982; SUTHERLAND et al., 1982; CORNER et al., 1983), fato que embasou sua adoção como teste de referência para a avaliação de outros testes sorológicos (MATHIAS & PINTO, 1983; MATHIAS et al., 1995; DAJER et al., 1999).

Com o intuito de avaliar algumas técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico da brucelose suína, GARCÍA-CARRILLO et al. (1971) infectaram 26 porcas e realizaram um estudo comparativo entre as seguintes provas: soroaglutinação em placa, soroaglutinação em tubos, prova do mercaptoetanol, prova do rivanol, reação de fixação de complemento (técnicas 50% e 100% de hemólise), prova do antígeno acidificado tamponado e prova de Coombs. Os autores concluíram que a RFC técnica 50% de hemólise e a prova de Coombs foram as mais sensíveis, tendo revelado anticorpos em 25 das 26 porcas inoculadas. Entretanto ALTON (1990) afirma que a RFC não é um teste tão efetivo para a detecção de anticorpos contra brucelas em suínos como é para a detecção em ruminantes.

No caso da RFC, também existem vários contratempos, apesar de ser um excelente teste confirmatório e preconizado pela OIE. Trata-se de teste complexo, bastante trabalhoso e que exige pessoal treinado, além de exigir o uso de reagentes lábeis, com necessidade de renovação e, portanto, titulação frequente, o que aumenta o trabalho envolvido em sua realização. Além disso, pode ser influenciado pela presença de imunoglobulinas séricas que se ligam ao antígeno sem fixar complemento, mormente IgG₂ (BERCOVICH, 1998).

Dessa forma, poucos laboratórios realizam esse teste, aumentando as chances de soros que percorrem longas distâncias chegarem aos laboratórios em más condições de conservação, o que, no caso desse teste, é especialmente problemático, em razão da ocorrência de atividade anticomplementar em soros mal conservados (DAJER et al., 1999). Outro ponto a ser analisado é que existe uma variação muito grande de técnicas utilizadas, não havendo uma padronização internacional (ALTON et al., 1975; ACHA & SZYFRES, 2001).

Em um inquérito sorológico no Canadá em 15.000 soros testados, FINLAY et al. (1987) encontraram 48 animais reagentes ao teste de aglutinação em placa utilizando o *BPA*. Todos os 48 foram negativos nos testes de RFC e ME. Um estudo de menor proporção realizado na Austrália por ROGERS et al. (1989) demonstrou melhor desempenho do AAT do que da RFC.

Outro inconveniente que tem essa técnica é a pouca praticidade para ser adotada em programas de controle; desta forma, poderia ser implantada somente em algumas granjas de animais com alto valor zootécnico (GARCIA-CARRILLO et al., 1971).

Na RFC, o excesso ou a predominância de IgG₂ pode induzir a ocorrência de fenômeno de prozona e reações falso-negativas. Não estão muito claras as causas desse fato, mas as sugeridas são: idade avançada do animal, exposições repetidas ao agente, condições ambientais levando a estresse e transferência ativa de IgG₁ para o colostro no período periparto (CHAPPEL, 1989). BRANDON et al. (1971) também se referem ao mecanismo fisiológico de transferência ativa de IgG₁ para o colostro nesse período, fazendo com que a concentração de IgG₁ circulante não seja suficiente para proporcionar a ocorrência de reação. Conforme

afirmaram TIMONEY et al. (1988), a IgG₂ bloqueia competitivamente o acesso de IgG₁ ao antígeno, na RFC. Ainda que a IgG₂ não fixe complemento, reage normalmente com o antígeno, gerando prozona. O resultado é uma reação falso-negativa. Nesses casos, o ME tem importante papel na análise final do sorodiagnóstico da amostra em estudo (PAULIN et al., 2002).

Ambos os testes confirmatórios aceitos pelo PNCEBT possuem suas vantagens e desvantagens, e existem muitos trabalhos comparando seus resultados. Além dos problemas na detecção de suínos com brucelose com os métodos tradicionais mencionados anteriormente, os testes sorológicos são menos satisfatórios do que para o diagnóstico da doença em outras espécies animais (bovinos, ovinos e caprinos); sendo assim, a avaliação sorológica deve basear-se na condição geral do rebanho (CORBEL, 2006).

De acordo com DEYOE (1986), a detecção de 80 a 90% dos suínos infectados é considerado um desempenho ótimo, diante dos problemas encontrados nessa espécie. Confirmando essa dificuldade, ROGERS et al. (1989) avaliaram três testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose suína e observaram uma sensibilidade de apenas 49,1% para a RFC. Quando compararam os resultados de seis testes sorológicos (imunoensaio de concentração de partícula fluorescente, RFC, AAT, teste de aglutinação em placa utilizando o BPA, SAL e teste do rivanol) com o isolamento de *B.suis*, FERRIS et al. (1995) observaram que nenhum dos testes isoladamente foi capaz de detectar todos os animais infectados, além de que oito suínos infectados tiveram resultado negativo em todos os testes sorológicos; a sensibilidade e a especificidade da RFC variou de 42 a 71% e 90 a 97%, respectivamente.

O teste do rivanol é simples, prático, rápido e de fácil realização (NIELSEN, 2002). É indicado como teste confirmatório para as amostras positivas ao teste do antígeno acidificado tamponado, e já foi usado em muitos países na luta contra a brucelose, como: Estados Unidos (HUBER & NICOLETTI, 1986; PAYEUR et al., 1990; NICOLETTI & TANYA, 1993; FERRIS et al., 1995; NIELSEN, 2002; RANGAN, 2002), México (NERI et al., 1993; ABIMERHI et al., 1998; DAJER et al., 1999; LUNA-MARTÍNEZ & MEJÍA-TERÁN, 2002), países da

América Central (MORENO, 2002), Venezuela (LORD & LORD, 1991), Equador (ZAMBRANO et al., 1991), Chile (ABALOS et al., 1996; TAMAYO et al., 1997), Argentina (PEREZ FRANCO & GARCIA-CARRILLO, 1970; CEDRO et al., 1977; NAVARRO et al., 1997), Portugal (SALES HENRIQUES et al., 1992), Espanha (JIMENÉZ DE BAGÜÉS et al., 1992), países do Oriente Médio (RAFAI, 2002), em nosso país (MOREIRA et al., 1988), entre outros.

A técnica do rivanol baseia-se em uma mistura de quantidades iguais de soro com uma solução de 1% de rivanol, o qual tem a propriedade de provocar a precipitação das moléculas de IgM. Essa mistura é centrifugada, e o sobrenadante é submetido à prova de soroaglutinação em placa (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1982).

O rivanol é uma prova de diagnóstico, em geral, com uma sensibilidade baixa. GARCIA-CARRILLO et al. (1971) relatam, em um trabalho realizado com suínos experimentalmente infectados, que o teste do rivanol foi capaz de identificar apenas 6 de 26 amostras avaliadas. A mesma situação foi observada por PEREZ FRANCO & GARCIA-CARRILLO (1970), que examinaram 1.525 soros de suínos abatidos em frigoríficos na cidade de Buenos Aires, Argentina, e encontraram a menor sensibilidade pelo teste do Rivanol, o qual detectou 4,8% de animais reagentes, enquanto os demais testes analisados detectaram 5,9% (ME), 6,5% (SAL) e 6,4% (RFC).

FERRIS et al. (1995), avaliando vários testes sorológicos, observaram que o teste do rivanol demonstrou-se superior em especificidade, variando entre 92 e 99%, quando comparado aos testes de imunoensaio de concentração de partícula fluorescente, RFC, AAT, teste de aglutinação em placa utilizando o *BPA* e *SAL*, entretanto sua sensibilidade foi a pior observada entre os 6 testes avaliados, variando de 43 a 73%. Nesse teste, a exemplo do que ocorre na prova do 2-mercaptoetanol, apenas a IgG reage, o que lhe confere maior especificidade (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1982).

MOREIRA et al. (1988) relatam que os resultados encontrados, quando compararam 6 provas sorológicas no diagnóstico da brucelose suína, foram de 75,4% de positivos na prova rápida em placa, 49,18% no AAT pH 4,0, 31,35% no

teste de redução pelo ME, 31,15% no AAT pH 3,5, e 27,87% na precipitação pelo rivanol. Esses resultados concordam com aqueles obtidos na pesquisa de PAYEUR et al. (1990), que verificaram que como teste de triagem o rivanol identificou 60% das amostras, não tendo uma sensibilidade como o do AAT (100%), mas que deveria considerar o uso desse teste como teste confirmatório em amostras positivas no AAT, devido a sua excelente especificidade, para evitar reações falso-positivas (NERI et al., 1993).

Essa alta especificidade é comentada por diversos autores, como, por exemplo, CEDRO et al. (1977), que relatam uma especificidade de 100% em seu estudo. No entanto, a legislação brasileira não prevê o uso dessa técnica e, além do mais, não há antígeno disponível no mercado brasileiro.

Uma alternativa seria o tratamento dos soros com rivanol e posterior exame pelo AAT, constituindo outro teste, o “antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol” (AAT-RIV), o qual já foi avaliado por MEIRELLES (2008) em bovinos. Em estudo realizado em 1.061 animais, a comparação entre os resultados do AAT-RIV e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME e RFC, o AAT-RIV apresentou uma sensibilidade relativa de 76,5%, com intervalo de confiança (95%) de 72,7% a 80,3%, e uma especificidade relativa de 100%. De acordo com esses resultados, o AAT-RIV poderia ser utilizado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose, sendo os animais com resultado positivo considerados infectados e aqueles com resultado negativo submetidos a um dos dois testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT. A inserção do AAT-RIV no esquema de diagnóstico constituiria uma opção rápida e de baixo custo para a confirmação dos resultados positivos no teste de triagem, que poderia até ser realizada pelo veterinário habilitado, sem maiores necessidades de recursos laboratoriais, exigindo, em relação à infraestrutura de que ele já dispõe, apenas o acréscimo de uma centrífuga.

Considerando as desvantagens dos testes preconizados pelo PNCEBT para a análise de amostras individuais, outras opções para diagnóstico podem ser adotadas, destacando-se o teste de polarização fluorescente. Este se baseia na

diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel marcado com fluorocromo e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Quanto mais complexa uma molécula, menor sua velocidade de rotação, resultando em uma reduzida taxa de despolarização da luz. Essa mudança na despolarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente (NIELSEN & GALL, 2001).

O primeiro trabalho aplicando essa técnica foi publicado por NIELSEN et al. (1996), para o diagnóstico da brucelose em bovinos. Os autores observaram que o teste apresenta a capacidade de combinar elevada sensibilidade com elevada especificidade. Outros estudos confirmaram essa observação (NIELSEN et al., 1998; SAMARTINO et al., 1999; DAJER et al., 1999; MCGIVEN et al., 2003).

O TPF já foi avaliado também para o diagnóstico da brucelose em bisão (GALL et al., 2000), humanos (LUCERO et al., 2003) e búfalo asiático (PAULIN, 2006). Em suínos, há na literatura dois estudos avaliando o desempenho do teste para diagnóstico da brucelose. NIELSEN et al. (1999), no Canadá, testaram 14.037 soros de suínos de rebanhos livres de brucelose, observando uma especificidade de 97,2%, e testaram 401 animais comprovadamente infectados, observando uma sensibilidade de 93,5%. Em outro estudo, realizado na Argentina, SILVA PAULO et al. (2000) constatarem especificidade de 98,3% e sensibilidade de 93,8%.

Diante disso, o projeto em pauta se propôs a estudar o desempenho da prova do antígeno acidificado tamponado após tratamento dos soros com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF) como técnicas para o diagnóstico sorológico da brucelose suína, como também testar a eficiência dos demais testes (AAT, SAL+ME e RFC) preconizados pela Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, pela qual a Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA estabelece normas para certificação de granjas de reprodutores suídeos. Deve-se salientar que tal tipo de estudo não é encontrado na literatura em relação ao AAT-RIV. Quanto ao TPF, apenas dois artigos foram publicados até o presente momento, nenhum deles no Brasil, estando, portanto, o teste carente de avaliação nas condições brasileiras.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

- Avaliar o desempenho de 6 testes sorológicos (antígeno acidificado tamponado -AAT-, mercaptoetanol e soroaglutinação lenta -SAL+ME-, fixação de complemento -RFC-, antígeno acidificado tamponado após tratamento com rivanol -AAT-RIV-, e teste de polarização fluorescente -TPF) no diagnóstico da brucelose suína.

4.2.2 Objetivos específicos

- Estimar a sensibilidade e a especificidade do TPF no diagnóstico sorológico da brucelose suína no Brasil;
- Estimar a sensibilidade e a especificidade do teste do AAT-RIV no diagnóstico sorológico da brucelose suína;
- Avaliar as técnicas sorológicas (AAT, SAL+ME e RFC) preconizadas pela Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estimando a sensibilidade e a especificidade de cada uma no diagnóstico sorológico da brucelose suína;
- Estimar a concordância entre os testes usados no diagnóstico sorológico da brucelose suína.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Obtenção das amostras

Para a realização da avaliação da eficiência dos testes sorológicos (AAT, AAT-RIV, SAL+ME, RFC e TPF) para diagnóstico da brucelose suína, foram colhidas e analisadas amostras de soros sanguíneos de 271 matrizes suínas e de 62 animais da terminação de uma propriedade da região de Jaboticabal-SP, onde ocorreu um foco de brucelose suína, do qual foi isolada *Brucella suis* biovar 1.

Também foram analisadas amostras de 1.100 suínos procedentes de rebanhos livres de brucelose colhidas em frigorífico do Estado de São Paulo. Esse número de amostras foi estipulado de acordo com as recomendações da OIE (JACOBSON, 1998).

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Diagnóstico de Brucelose, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

4.3.2 Técnicas laboratoriais

4.3.2.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e “card test”, foi realizado conforme a técnica recomendada no Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.1 do Capítulo 2.

4.3.2.2 Teste do 2-mercaptoetanol (ME)

Essa técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.2 do Capítulo 2.

4.3.2.3 Teste de soroaglutinação lenta (SAL)

Também chamada de teste de soroaglutinação em tubos (SAT), essa prova é utilizada em associação com o teste do ME para confirmar resultados positivos na prova de triagem. A técnica foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (BRASIL, 2006), descrita no item 2.3.3.3 do Capítulo 2.

4.3.3.4 Reação de fixação de complemento (RFC)

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por ALTON et al. (1988), realizada conforme descrita no item 2.3.3.4 do Capítulo 2.

4.3.2.5 Teste da polarização fluorescente (TPF)

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por NIELSEN et al. (1999), utilizando o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA.

Nos tubos de ensaio referentes aos soros de controle (positivo e negativo), foram colocados 990µL de solução-tampão e 10µL dos soros de

controle; nos demais tubos foram depositados 960µL de solução-tampão e 40µL de soros sanguíneos de suínos. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos, e as amostras foram submetidas a um primeiro ciclo de leitura, em um analisador de polarização fluorescente modelo Sentry 100 (Diachemix, USA).

Após a primeira leitura, em cada tubo foi adicionado um volume de 10µL de conjugado (antígeno lipopolissacarídeo marcado com fluoresceína), aguardando-se um tempo de incubação de pelo menos 2 minutos à temperatura ambiente. Passado esse período, os tubos foram novamente agitados e foi realizado o segundo ciclo de leitura na mesma ordem em que foi feita a primeira leitura.

A taxa de despolarização da luz é captada pelo aparelho de polarização fluorescente, e o resultado do teste é expresso em unidades de milipolarização (mP). O valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro analisado.

Para a interpretação dos resultados, foram considerados negativos os soros com até 9,9 mP acima do valor observado para o soro controle-negativo testado no mesmo lote da amostra em questão, suspeitos aqueles com diferença de 10,0 a 19,9 mP acima, e positivos os soros com diferença igual ou superior a 20 mP acima do valor do soro controle-negativo, conforme recomenda o fabricante.

Os resultados do teste de polarização fluorescente foram interpretados também usando um ponto de corte fixo. O ponto de corte escolhido foi aquele que resultou na maior soma de sensibilidade e especificidade relativas obtidas pela comparação com a condição verdadeira estabelecida pela combinação dos resultados dos testes AAT, SAL+ME e RFC. A maior soma de sensibilidade e especificidade indica o ponto de melhor combinação dessas duas propriedades (DOHOO et al., 2003).

4.3.2.6 Teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol

Foi utilizado antígeno comercial produzido com *Brucella abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto Biológico de São Paulo, preparado de acordo com a técnica recomendada pelo Ministério da Agricultura, corado com rosa de Bengala (Brasil, 2004b).

A solução de rivanol (6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate) foi preparada de acordo com a descrição do Centro Panamericano de Zoonosis (1982), na concentração de 1%, em água destilada.

Para o tratamento dos soros com rivanol, colocavam-se, em um tubo de centrífuga, 200 µL da amostra de soro e 200 µL da solução de rivanol 1%. Agitava-se o tubo para promover a homogeneização e deixava-se em descanso à temperatura ambiente por 10 a 60 minutos. Centrifugava-se a mistura a 1.000 G durante 5 a 10 minutos, e após esse tratamento o sobrenadante era submetido ao AAT, considerando resultado positivo a ocorrência de grumos de aglutinação e negativo a ausência desses grumos.

4.3.3 Análise dos dados

Para a comparação entre os resultados das diversas provas foi calculado o coeficiente Kappa, usando a seguinte fórmula (LANDIS & KOCK, 1977):

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

$$Po \text{ (proporção de concordâncias observadas)} = \frac{a + b}{N}$$

$$Pe \text{ (proporção de concordâncias esperadas)} = \frac{\{(a+b) \cdot (a+c)\} + \{(c+c) \cdot (b+d)\}}{N^2}$$

Em que:

- a = resultado positivo em ambos os testes;
- b = resultado positivo no 1º teste e negativo no 2º;
- c = resultado negativo no 1º teste e positivo no 2º;
- d = resultado negativo em ambos os testes;
- N = total de amostras examinadas.

A interpretação do resultado foi feita de acordo com os critérios adotados por PEREIRA (2000), apresentados no quadro 1.

A sensibilidade dos testes avaliados foi calculada pela proporção de resultados positivos obtidos ao testar os animais do rebanho infectado do Município de Jaboticabal, SP. A especificidade foi calculada pela proporção de resultados negativos obtidos ao testar os animais procedentes de rebanhos livres, cujo soro sanguíneo foi colhido em frigorífico do Estado de São Paulo.

Foram calculadas também a sensibilidade e a especificidade relativas dos testes avaliados, comparando seus resultados com a combinação dos resultados de outros testes (AAT x SAL+ME/RFC/TPF; SAL+ME x AAT/RFC/TPF; RFC x AAT/SAL+ME/TPF; AAT-RIV x AAT/SAL+ME/RFC; TPF x AAT/SAL+ME/RFC).

Tanto para a sensibilidade quanto para a especificidade, foi calculado o intervalo de confiança, de acordo com a metodologia mencionada por THORNER & REMEIN (1961).

Quadro 1. Interpretação de Kappa, segundo PEREIRA (2000), adaptado de Landis & Kock (1977).

Kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

4.4 RESULTADOS

Dos 1.433 soros sanguíneos analisados, 284 (19,82%) apresentaram resultado positivo no AAT e 1.149 (80,18%) apresentaram resultado negativo, ao passo que 231 (16,12%) apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 1.202 (83,88%) apresentaram resultado negativo. Das 284 amostras positivas no AAT, 231 (81,34%) também apresentaram resultado positivo no AAT-RIV, e 53 (18,66%) apresentaram resultado negativo. Já as 1.149 amostras negativas no AAT foram todas negativas também no AAT-RIV (tabela 1). Nessa situação, observou-se uma concordância ótima, pois se obteve um valor de kappa igual a 0,87.

Tabela 1. Comparação entre os resultados obtidos por meio teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	AAT-RIV		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	231	53	284
Negativo	0	1.149	1.149
TOTAL	231	1.202	1.433

K = 0,87

A tabela 2 ilustra os resultados obtidos pela prova do AAT (negativos ou positivos) e pela combinação das provas SAL+ME, conforme prevê a legislação brasileira (negativos, inconclusivos e positivos). Das 284 amostras positivas no AAT, 14 (4,93%) foram negativas na combinação SAL+ME, 6 (2,11%) foram inconclusivas e 264 (92,96%) tiveram o resultado positivo confirmado. Quanto às

1.149 amostras negativas no AAT, 1.147 (99,83%) também foram negativas na combinação SAL+ME, 1 (0,09%) foi inconclusiva, e 1 (0,09%) apresentou resultado positivo. Desconsiderando as 7 amostras com resultado inconclusivo na combinação SAL+ME (tabela 3), observou-se uma concordância ótima, pois o valor de kappa foi igual a 0,97.

Quando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME foram considerados positivos, observou-se uma diminuição do valor de kappa (0,93) comparado ao da situação anterior (0,97). O mesmo ocorreu quando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME foram considerados negativos: o valor de kappa foi menor (0,95) quando comparado ao valor apresentado na tabela 3 (0,97), com uma concordância ótima.

Tabela 2. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	SAL+ME			TOTAL
	Positivo	Inconclusivo	Negativo	
Positivo	264	6	14	284
Negativo	1	1	1.147	1.149
TOTAL	265	7	1.161	1.433

Tabela 3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	264	14	278
Negativo	1	1.147	1.148
TOTAL	265	1.161	1.426

K = 0,97

Das 284 amostras com resultado positivo no AAT, 13 (4,58%) não apresentaram título na RFC, 3 (1,06%) reagiram na diluição 1:2, e as outras 268 (94,37%) apresentaram reação a partir da diluição 1:4, amostras essas classificadas como positivas nesse teste. Pôde-se observar também que, das 1.149 amostras com resultado negativo no AAT, 3 (0,26%) apresentaram resultado positivo na RFC, com título 4 em 2 amostras e 1 amostra com título 8, e as outras 1.146 (99,74%) não expressaram título nenhum nessa prova (tabela 4). A comparação entre os testes AAT e RFC (tabela 5) resultou em uma concordância ótima, com um indicador kappa igual a 0,96.

Tabela 4. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
Positivo	13	3	11	29	25	41	48	114	284
Negativo	1146	0	2	1	0	0	0	0	1.149
TOTAL	1.159	3	13	30	25	41	48	114	1.433

- = ausência de reação

Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	RFC		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	268	16	284
Negativo	3	1.146	1.149
TOTAL	271	1.162	1.433

K = 0,96

Dos 1.433 animais examinados, 756 apresentaram resultado de até 70 mP, 275 apresentaram de 70,1 a 75,0, 88 apresentaram de 75,1 a 80,0, 25 apresentaram de 80,1 a 85,0, 10 apresentaram de 85,1 a 90,0, e os demais 279 apresentaram resultado acima de 90,1 mP, sendo 275,9 mP o valor mais alto observado.

Comparados os resultados do AAT com a interpretação dos resultados do TPF, observou-se que, das 284 amostras positivas no AAT, 15 (5,28%) foram negativas no TPF, 4 (1,41%) foram suspeitas e 265 (93,31%) tiveram o resultado positivo confirmado. Quanto às 1.149 amostras negativas no AAT, 1.120 (97,48%) também foram negativas, 19 (1,65%) foram suspeitas, e 10 (0,87%) apresentaram resultado positivo (tabela 6). Desconsiderando as 23 amostras com resultado suspeito no TPF (tabela 7), observa-se uma concordância ótima, pois o valor de kappa foi igual a 0,94.

A concordância também foi ótima quando foram considerados positivos os resultados suspeitos ou quando considerados negativos, isso porque os valores de kappa foram 0,91 e 0,94, respectivamente. Quando considerados negativos os resultados suspeitos no TPF, a proporção de resultados concordantes entre os dois testes foi maior do que quando considerados positivos, de 97,98 % e 96,93, respectivamente.

Tabela 6. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	TPF			TOTAL
	Positivo	Suspeito	Negativo	
Positivo	265	4	15	284
Negativo	10	19	1.120	1.149
TOTAL	275	23	1.135	1.433

Tabela 7. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	265	15	280
Negativo	10	1.120	1.130
TOTAL	275	1.135	1.410

K = 0,94

Na tabela 8, podem ser observados os valores obtidos pela prova do AAT-RIV e pela combinação das provas SAL+ME. Das 265 amostras com resultado positivo na combinação, 231 (87,17%) também apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 34 (12,83%) apresentaram resultado negativo. Todas as 7 amostras que apresentaram resultado inconclusivo na combinação SAL+ME apresentaram resultado negativo no AAT-RIV, e nenhuma das 1.161 amostras com resultado negativo na combinação apresentou resultado positivo no AAT-RIV.

A tabela 9 apresenta a comparação dos resultados obtidos nos testes AAT-RIV e SAL+ME, excluindo os resultados inconclusivos. Observa-se que 231 amostras apresentaram resultado positivo em ambas as provas e 1.161 apresentaram resultado negativo nas duas provas, o que significa uma proporção de 97,62% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,92, ou seja, concordância ótima. Esse mesmo valor de kappa (0,92) foi observado quando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME foram considerados negativos. Quando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME foram considerados positivos, o valor de kappa foi igual a 0,90, expressando também uma ótima concordância.

Tabela 8. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	SAL+ME			TOTAL
	Positivo	Inconclusivo	Negativo	
Positivo	231	0	0	231
Negativo	34	7	1.161	1.202
TOTAL	265	7	1.161	1.433

Tabela 9. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	231	0	231
Negativo	34	1.161	1.195
TOTAL	265	1.161	1.426

K = 0,92

Observando-se a tabela 10, nota-se que, dos 231 soros positivos no AAT-RIV, 1 (0,43%) não apresentou título na RFC, ao passo que os outros 230 (99,57%) apresentaram título a partir de 4 na RFC. Dos 1.202 soros negativos no AAT-RIV, 1.158 (96,34%) não apresentaram título na RFC, 3 (0,25%) apresentaram título 2, 39 (3,24%) apresentaram títulos variando de 4 a 64, e 2 (0,17%), título igual ou superior a 128.

Quando as provas de RFC e AAT-RIV foram comparadas (tabela 11), encontrou-se um valor de kappa igual a 0,90, caracterizando uma concordância ótima entre os dois testes.

Tabela 10. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com os títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
Positivo	1	0	4	10	18	38	48	112	231
Negativo	1.158	3	9	20	7	3	0	2	1.202
TOTAL	1.159	3	13	30	25	41	48	114	1.433

- = ausência de reação

Tabela 11. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da reação de fixação de complemento (RFC) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	RFC		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	230	1	231
Negativo	41	1.161	1.202
TOTAL	271	1.162	1.433

$K = 0,90$

Na tabela 12, podem ser observados os resultados obtidos na prova do AAT-RIV e no TPF. Das 275 amostras com resultado positivo no TPF, 225 (81,82%) também apresentaram resultado positivo no AAT-RIV e 50 (18,18%) apresentaram resultado negativo. Das 23 amostras que apresentaram resultado suspeito no TPF, 20 (86,96%) apresentaram resultado negativo no AAT-RIV, e das 1.135 amostras com resultado negativo no TPF, 3 (0,26%) apresentaram resultado positivo no AAT-RIV.

A tabela 13 apresenta a comparação dos resultados obtidos nos testes AAT-RIV e TPF, excluindo os resultados suspeitos. Observa-se que 225 amostras apresentaram resultado positivo em ambas as provas e 1.132 apresentaram resultado negativo nas duas provas, o que significa uma proporção de 96,24% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,87, ou seja, concordância ótima.

Quando se compara os resultados obtidos no AAT-RIV e no TPF, considerando positivos os resultados suspeitos obtidos neste último teste, das 231 amostras positivas no AAT-RIV, 3 (1,30%) foram negativas no TPF e 228 (98,70%) tiveram o resultado positivo confirmado. Quanto às 1.202 amostras

negativas no AAT-RIV, 1.132 (94,18%) também foram negativas no TPF, e 70 (5,82%) apresentaram resultados positivos. Considerando negativas as amostras com resultados suspeitos no TPF, observou-se uma concordância ótima, pois o valor de kappa foi igual a 0,87.

Tabela 12. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	TPF			TOTAL
	Positivo	Suspeito	Negativo	
Positivo	225	3	3	231
Negativo	50	20	1.132	1.202
TOTAL	275	23	1.135	1.433

Tabela 13. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	225	3	228
Negativo	50	1.132	1.182
TOTAL	275	1.135	1.410

K = 0,87

Quando comparados os resultados da RFC com os da combinação dos testes SAL+ME (Tabelas 14 e 15), observa-se que, dos 1.161 soros com resultado negativo na combinação, 1.156 (99,57%) apresentaram resultado negativo na RFC, 1 amostra (0,09%) apresentou título 4, e 4 amostras (0,34%) apresentaram título 8, resultando em 5 amostras (0,43%) positivas na RFC. Das 7 amostras com resultado inconclusivo na combinação, 3 (42,86%) apresentaram resultado negativo na RFC, sendo 1 com título igual a 2, mas nesta técnica considerado um resultado negativo, e 4 amostras (57,14%) apresentaram resultado positivo, sendo 2 delas com título 4, uma com título 8 e uma com título igual a 32.

Excluindo as amostras com resultado inconclusivo (tabela 15), verifica-se que, das 267 amostras positivas na RFC, 262 (98,13%) foram positivas também na combinação SAL+ME e 5 (1,87%) foram negativas. Das 1.159 amostras negativas na RFC, 1.156 (99,74%) foram negativas também na combinação e 3 (0,26%) foram positivas. A proporção de resultados concordantes entre esses dois testes confirmatórios foi de 99,44%, resultando em kappa igual a 0,98, ou seja, concordância ótima.

Considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME em comparação com a RFC observa-se que 266 amostras apresentaram resultado positivo em ambas as provas e 1.156 apresentaram resultado negativo nas duas provas, o que significa uma proporção de 99,23% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,97, ou seja, concordância ótima. Quando as amostras com resultados inconclusivos foram classificadas como negativas, a proporção de resultados concordantes foi de 99,16%, com o mesmo valor de Kappa da situação anterior (0,97).

Tabela 14. Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

SAL+ME	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
Positivo	1	2	10	25	25	40	48	114	265
Inconclusivo	2	1	2	1	0	1	0	0	7
Negativo	1.156	0	1	4	0	0	0	0	1.161
TOTAL	1.159	3	13	30	25	41	48	114	1.433

- = ausência de reação

Tabela 15. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	262	5	267
Negativo	3	1.156	1.159
TOTAL	265	1.161	1.426

K = 0,98

Dos 1.433 soros sanguíneos analisados, 275 (19,19%) apresentaram resultado positivo no TPF, 23 (1,61%) foram classificados como resultado suspeito e 1.135 (79,20%) apresentaram resultado negativo, ao passo que 265 (18,49%) apresentaram resultado positivo na combinação dos testes SAL+ME, 7 (0,49%) resultaram inconclusivos e 1.161 (81,02%) apresentaram resultado negativo (tabela 16).

Desconsiderando as amostras com resultado inconclusivo na combinação dos testes SAL+ME e as amostras suspeitas no TPF (tabela 17), verifica-se que, das 271 amostras positivas no TPF, 259 (95,57%) foram também positivas na combinação SAL+ME e 12 (4,43%) foram negativas. Das 1.133 amostras negativas no TPF, 1.130 (99,74%) foram negativas também na combinação e 3 (0,26%) foram positivas. A proporção de resultados concordantes entre esses dois testes confirmatórios foi de 98,93%, resultando em kappa igual a 0,96, ou seja, concordância ótima.

Quando se compara os resultados obtidos no SAL+ME e no TPF, considerando positivos os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, das 272 amostras positivas no SAL+ME, 5 (1,84%) foram negativas no TPF e 267 (98,16%) tiveram o resultado positivo confirmado. Quanto às 1.161 amostras negativas no SAL+ME, 1.130 (97,33%) também foram negativas no TPF, e 31 (2,67%) apresentaram resultados positivos; esse valores levaram a um kappa igual a 0,92.

Quando consideradas negativas as amostras com resultados suspeitos na no TPF, observou-se uma concordância ótima, pois o valor de kappa foi igual a 0,95. Nesta situação, o valor de resultados concordantes entre as técnicas (SAL+ME e TPF) foi de 98,46%.

Tabela 16. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	SAL+ME			TOTAL
	Positivo	Inconclusivo	Negativo	
Positivo	259	4	12	275
Suspeito	3	1	19	23
Negativo	3	2	1.130	1.135
TOTAL	265	7	1.161	1.433

Tabela 17. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), desconsiderando os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	259	12	271
Negativo	3	1.130	1.133
TOTAL	262	1.142	1.404

K = 0,96

Comparando os resultados da RFC com os do TPF (tabelas 18 e 19), observa-se que, dos 1.135 soros com resultado negativo no TPF, 1.130 (99,56%) apresentaram resultado negativo na RFC, 5 amostras (0,44%) foram positivas na RFC, 1 amostra com título 8, 1 com título 32, 1 título 64 e 2 com título maior ou igual a 128. Das 23 amostras com resultado suspeito no TPF, 20 (86,96%) não apresentaram nenhuma titulação na RFC, mas 3 amostras (13,04%) apresentaram resultado positivo, com título igual a 64.

Excluindo as amostras com resultado suspeito no TPF (tabela 19), verifica-se que, das 268 amostras positivas na RFC, 263 (98,13%) foram também positivas naquele teste e 5 (1,87%) foram negativas. Das 1.142 amostras negativas na RFC, 1.130 (98,95%) foram negativas também no TPF e 12 (1,05%) foram positivas. A proporção de resultados concordantes entre esses dois métodos de diagnóstico foi de 98,79%, resultando em kappa igual a 0,96, ou seja, concordância ótima.

Comparando a RFC com o TPF, considerando como positivos os resultados suspeitos nesse último teste, observa-se que 266 amostras apresentaram resultado positivo em ambas as provas e 1.130 apresentaram resultado negativo nas duas provas, o que significa uma proporção de 97,42% de resultados concordantes, resultando em kappa igual a 0,92, ou seja, concordância ótima. Quando as amostras com resultados suspeitos foram classificadas como negativas, a proporção de resultados concordantes foi de 98,60%, isso porque, das 1.433 amostras, 263 foram positivas em ambos os testes, e 1.150, negativas. O valor de Kappa foi igual a 0,95.

Tabela 18. Títulos obtidos na reação de fixação de complemento (RFC) comparados com a interpretação do teste de polarização fluorescente (TPF) para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	RFC								TOTAL
	-	2	4	8	16	32	64	≥128	
Positivo	9	3	13	29	25	40	44	112	275
Suspeito	20	0	0	0	0	0	3	0	23
Negativo	1.130	0	0	1	0	1	1	2	1.135
TOTAL	1.159	3	13	30	25	41	48	114	1.433

- = ausência de reação

Tabela 19. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), desconsiderando os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	263	5	268
Negativo	12	1.130	1.142
TOTAL	275	1.135	1.410

K = 0,96

Na tabela 20 estão expressos os valores de sensibilidade de todas as técnicas de diagnóstico avaliadas neste estudo (AAT, AAT-RIV, SAL+ME, RFC e TPF) admitindo que todas as matrizes da granja estavam infectadas. O TPF resultou em 95,94% de sensibilidade, sendo assim o teste mais sensível nesta condição. O segundo teste mais sensível foi o AAT, com 94,83%, seguido do teste de RFC, com 93,73%, da combinação do SAL+ME, com 92,25% e, por último, o teste do AAT-RIV, com 79,70% de sensibilidade.

Tabela 20. Valores de sensibilidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), considerando infectadas todas as matrizes da granja.

	AAT	AAT-RIV	SAL+ME	RFC	TPF
Positivo	257	216	250	254	260
Negativo	14	55	21	17	11
Total	271	271	271	271	271
SENSIBILIDADE	94,83%	79,70%	92,25%	93,73%	95,94%

Quando foram considerados infectados os suínos da granja (matrizes e da terminação) com resultado positivo em pelo menos um dos testes oficialmente adotados no Brasil, o valor da sensibilidade aumenta de todos os testes, mas a colocação entre eles continua sendo a mesma (tabela 21).

Tabela 21. Valores de sensibilidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF), considerando infectados os suínos da granja (matrizes e da terminação) com resultado positivo em pelo menos um dos testes oficialmente adotados no Brasil.

	AAT	AAT-RIV	SAL + ME	RFC	TPF
Positivo	276	231	265	271	268
Negativo	3	48	14	8	11
Total	279	279	279	279	279
SENSIBILIDADE	98,92%	82,80%	94,98%	97,13%	96,06

Quando considerados não infectados todos os suínos do frigorífico, os testes com maior especificidade foram a RFC, a combinação SAL+ME e o AAT-RIV, apresentando 100% (tabela 22 e 23). Quando as 17 amostras suspeitas no TPF foram consideradas negativas (tabela 22), a especificidade do AAT foi inferior à do TPF, 99,27% e 99,55%, respectivamente. O mesmo foi observado quando essas amostras suspeitas foram descartadas (tabela 23): a especificidade do TPF foi maior que a do AAT, apresentando 99,54% e 99,27%, respectivamente.

Tabela 22. Valores de especificidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF) considerando não infectados todos os suínos do frigorífico e negativas as amostras suspeitas no TPF.

	AAT	AAT-RIV	SAL + ME	RFC	TPF
Positivo	8	0	0	0	5
Negativo	1.092	1.100	1.100	1.100	1.095
Total	1.100	1.100	1.100	1.100	1100
ESPECIFICIDADE	99,27%	100%	100%	100%	99,55%

Tabela 23. Valores de especificidade do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e teste de polarização fluorescente (TPF) considerando como não infectados todos os suínos do frigorífico e desconsiderando as amostras suspeitas no TPF.

	AAT	AAT-RIV	SAL + ME	RFC	TPF
Positivo	8	0	0	0	5
Negativo	1.092	1.100	1.100	1.100	1.078
Total	1.100	1.100	1.100	1.100	1.083
ESPECIFICIDADE	99,27%	100%	100%	100%	99,54%

Comparando os resultados obtidos no AAT e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas SAL+ME, RFC e

TPF (tabela 24), observa-se que, entre os 1.385 soros, o AAT apresentou 1.375 (99,28%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 256 animais classificados como infectados, apenas uma amostra (0,39%) apresentou resultado negativo no AAT, revelando uma sensibilidade de 99,61%, com intervalo de confiança variando de 99,28% a 99,94%, com 95% de probabilidade. Dos 1.129 animais classificados como livres da infecção, 1.120 resultaram negativos no AAT, o que indica uma especificidade relativa de 99,20%, com intervalo de confiança variando de 98,73% a 99,67%, com 95% de probabilidade. O valor preditivo positivo do teste foi de 96,59%, isso porque apenas 9 amostras foram positivas no AAT, mas classificadas como de animais não infectados. Uma vez que 1.120 dos animais com resultados negativos no AAT foram classificados como não infectados, o valor preditivo negativo do teste foi de 99,91%.

Tabela 24. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	SAL + ME / RFC / TPF		TOTAL
	Infectados	Não Infectados	
Positivo	255	9	264
Negativo	1	1.120	1.121
TOTAL	256	1.129	1.385

Sensibilidade relativa = $(255 / 256) \times 100 = 99,61\%$

Intervalo de confiança (95%) = {99,28% — 99,94%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.129) \times 100 \% = 99,20\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,73% — 99,67%}

Na tabela 25, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos na combinação SAL+ME e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, RFC e TPF. Observa-se que, entre os 1.377 soros, a combinação SAL+ME apresentou 1.375 resultados concordantes, o que corresponde a 99,85% de resultados coerentes com a condição verdadeira, 99,22% de sensibilidade e 100% de especificidade relativa.

Uma vez que todos os animais com resultados negativos na combinação foram classificados como não infectados, o valor preditivo positivo do teste foi de 100%; já o valor preditivo negativo foi 99,82%, porque 2 amostras resultaram negativas na combinação SAL+ME, mas classificadas como de animais infectados.

Tabela 25. Resultados da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

SAL + ME	AAT / RFC / TPF		TOTAL
	Infectados	Não Infectados	
Positivo	255	0	255
Negativo	2	1.120	1.122
TOTAL	257	1.120	1.377

Sensibilidade relativa = $(255 / 257) \times 100 = 99,22\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,76% — 99,68%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.120) \times 100 \% = 100\%$

Quando comparados os resultados obtidos na RFC e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME e TPF (tabela 26), observa-se que, entre os 1.378 soros, a RFC apresentou 1.375 (99,78%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 258 animais classificados como infectados, 255 apresentaram resultado positivo na RFC, o que significa uma sensibilidade relativa de 98,84%, com intervalo de confiança variando de 98,27% a 99,41%, com 95% de probabilidade. Todos os 1.120 animais classificados como livres da infecção resultaram negativos na RFC, o que indica uma especificidade relativa de 100% e, conseqüentemente, um valor preditivo positivo também de 100%. O valor preditivo negativo foi de 99,73%, ou seja, das 1.123 amostras com resultado negativo na RFC, 1.120 foram classificadas como de animais não infectados.

Tabela 26. Resultados do teste de reação de fixação de complemento (RFC) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e da polarização fluorescente (TPF), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	AAT / SAL + ME / TPF		TOTAL
	Infectados	Não Infectados	
Positivo	255	0	255
Negativo	3	1.120	1.123
TOTAL	258	1.120	1.378

Sensibilidade relativa = $(255 / 258) \times 100 = 98,84\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,27% — 99,41%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.120) \times 100 \% = 100\%$

Na tabela 27, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos no AAT-RIV e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas oficialmente adotadas pela legislação brasileira (AAT, SAL+ME, RFC), considerando infectados os animais com resultado positivo em todos os testes oficiais e não infectados animais com todos os resultados negativos nos mesmos testes. Observa-se que, entre os 1.406 soros, o AAT-RIV apresentou 1.375 (97,80%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 261 animais classificados como infectados, 230 apresentaram resultado positivo no AAT-RIV, o que significa uma sensibilidade relativa de 88,12%, com intervalo de confiança variando de 86,43% a 89,81%, com 95% de probabilidade. Todos os 1.145 animais classificados como livres da infecção apresentaram resultado negativo no AAT-RIV, o que indica uma especificidade relativa de 100%. Uma vez que todos os animais com resultados positivos no AAT-RIV foram classificados como infectados, o valor preditivo positivo do teste foi de 100%, ao passo que o valor preditivo negativo foi de 97,36%, ou seja, das 1.176 amostras com resultado negativo no AAT-RIV, 1.145 foram classificadas como de animais não infectados.

Quando se realiza a comparação entre os resultados obtidos no AAT-RIV e a condição verdadeira do animal (estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME e RFC), considerando infectados animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes oficialmente adotados no Brasil e não infectados os animais com todos os resultados negativos (tabela 28), pode-se observar que, entre os 1.429 soros, o AAT-RIV apresentou 1.376 (96,29%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 284 animais classificados como infectados, 231 apresentaram resultado positivo no AAT-RIV, o que significa uma sensibilidade relativa de 81,34%, com intervalo de confiança variando de 79,32% a 83,36%, com 95% de probabilidade. Os 1.145 animais classificados como livres da infecção apresentaram resultados negativos no AAT-RIV, o que indica uma especificidade relativa de 100%. O valor preditivo positivo do teste foi de 100%, porque todos os animais com resultados positivos no AAT-RIV foram classificados como infectados, e o valor preditivo negativo foi de 95,58%, ou seja,

das 1.198 amostras com resultado negativo no AAT-RIV, 1.145 foram classificadas como de animais não infectados.

Tabela 27. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados*	Não Infectados**	
Positivo	230	0	230
Negativo	31	1.145	1.176
TOTAL	261	1.145	1.406

* Animais com resultado positivo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(230 / 261) \times 100 = 88,12\%$

Intervalo de confiança (95%) = {86,43% — 89,81%}

Especificidade relativa = $(1.145 / 1.145) \times 100 \% = 100,0\%$

Tabela 28. Resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) em comparação com a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	AAT / SAL+ME / RFC		TOTAL
	Infectados*	Não infectados**	
Positivo	231	0	231
Negativo	53	1.145	1.198
TOTAL	284	1.145	1.429

* Animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes AAT, SAL+ME e RFC

** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(231 / 284) \times 100 = 81,34\%$

Intervalo de confiança (95%) = {79,32% — 83,36%}

Especificidade relativa = $(1.145 / 1.145) \times 100 \% = 100,0\%$

Na tabela 29, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos pelo TPF e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas oficialmente preconizadas pela legislação brasileira (AAT, SAL+ME, e RFC). Neste caso, observa-se que, entre os 1.406 soros, o TPF apresentou 1.375 (97,80%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Na tabela 30, na qual foram desconsiderados os resultados suspeitos do TPF, pode-se observar que, dos 258 animais classificados como infectados, 255 apresentaram resultado positivo no TPF, o que significa uma sensibilidade relativa de 98,84%, com intervalo de confiança variando de 98,28% a 99,40%, com 95% de probabilidade. Dos 1.127 animais classificados como livres da infecção, 1.120 resultaram negativos no TPF, o que indica uma especificidade relativa de 99,38%,

com intervalo de confiança variando de 98,97% a 99,79%, com 95% de probabilidade. O valor preditivo positivo do teste foi de 97,33%, porque, dos 262 animais com resultados positivos no TPF, 255 foram classificados como infectados, e o valor preditivo negativo foi de 99,73%, ou seja, das 1.123 amostras com resultado negativo no TPF, 1.120 foram classificadas como de animais não infectados.

Na tabela 31, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos no TPF e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME, RFC, considerando infectados animais com resultado positivo em todos os testes e não infectados animais com todos os resultados negativos, além de considerar positivos os resultados suspeitos no TPF. Observa-se que, entre os 1.406 soros, o TPF apresentou 1.378 (98,00%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 261 animais classificados como infectados, 258 apresentaram resultado positivo no TPF, o que significa uma sensibilidade relativa de 98,85%, com intervalo de confiança variando de 98,29% a 99,41%, com 95% de probabilidade. Dos 1.145 animais classificados como livres da infecção, 1.120 apresentaram resultado negativo no TPF, o que indica uma especificidade relativa de 97,82%, com intervalo de confiança variando de 97,06% a 98,58%, com 95% de probabilidade. Uma vez que 258 dos 283 resultados positivos no TPF foram classificados como de animais infectados, o valor preditivo positivo do teste foi de 91,17%, ao passo que o valor preditivo negativo foi de 99,73%, ou seja, das 1.123 amostras com resultado negativo no TPF, 1.120 foram classificadas como de animais não infectados.

A tabela 32 compara os resultados obtidos no TPF e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME e RFC, considerando infectados animais com resultado positivo em todos os testes oficialmente adotados no Brasil e não infectados os animais com todos os resultados negativos, e considerando negativos os resultados suspeitos no TPF. Observa-se que, entre os 1.406 soros, o TPF apresentou 1.393 (99,10%) resultados coerentes com a condição verdadeira. Dos 261 animais classificados como infectados, 255 apresentaram resultado positivo no TPF, o que significa uma

sensibilidade relativa de 97,70%, com intervalo de confiança variando de 96,92% a 98,48%, com 95% de probabilidade. Dos 1.145 animais classificados como livres da infecção, 1.138 resultaram negativos no TPF, o que indica uma especificidade relativa de 99,39%. O valor preditivo positivo do teste foi de 97,33%, porque das 262 amostras com resultados positivos no TPF, 255 foram classificadas como de animais infectados, e o valor preditivo negativo foi de 99,48%, ou seja, das 1.144 amostras com resultado negativo no TPF, 1.138 foram classificadas como de animais não infectados.

Tabela 29. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados*	Não Infectados**	
Positivo	255	7	262
Suspeito	3	18	21
Negativo	3	1.120	1.123
TOTAL	261	1.145	1.406

* Animais com resultado positivo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Tabela 30. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	255	7	262
Negativo	3	1.120	1.123
TOTAL	258	1.127	1.385

* Desconsiderando as amostras suspeitas no TPF

** Animais com resultado positivo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(255 / 258) \times 100 = 98,84\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,28% — 99,40%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.127) \times 100 \% = 99,38\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,97% — 99,79%}

Tabela 31. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	258	25	283
Negativo	3	1.120	1.123
TOTAL	261	1.145	1.406

* Considerando as amostras suspeitas no TPF como positivas

** Animais com resultado positivo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(258 / 261) \times 100 = 98,85\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,29% — 99,41%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.145) \times 100 \% = 97,82\%$

Intervalo de confiança (95%) = {97,06% — 98,58% }

Tabela 32. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroprecipitação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	255	7	262
Negativo	6	1.138	1.144
TOTAL	261	1.145	1.406

* Considerando as amostras suspeitas no TPF como negativas

** Animais com resultado positivo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(255 / 261) \times 100 = 97,70\%$

Intervalo de confiança (95%) = {96,92% — 98,48%}

Especificidade relativa = $(1.138 / 1.145) \times 100 \% = 99,39\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,98% — 99,80%}

Comparando os resultados obtidos no TPF e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+ME e RFC (tabela 33), considerando infectados animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes oficialmente adotados no Brasil e não infectados animais com todos os resultados negativos, observa-se que, entre os 1.429 soros, o TPF apresentou 1.385 (96,92%) resultados coerentes com a condição verdadeira.

Na tabela 34, foram desconsideradas as amostras suspeitas no TPF, e das 280 classificadas como infectadas, 265 apresentaram resultado positivo no TPF, o que significa uma sensibilidade relativa de 94,64%, com intervalo de confiança variando de 93,46% a 95,82%, com 95% de probabilidade. Dos 1.127 animais classificados como livres da infecção, 1.120 amostras apresentaram resultados negativos no TPF, o que indica uma especificidade relativa de 99,38%, com intervalo de confiança variando de 98,97% a 99,79%, com 95% de probabilidade. Uma vez que, dos 280 animais classificados como infectados, 265 foram positivos no TPF, o valor preditivo positivo do teste foi de 97,43%, ao passo que o valor preditivo negativo foi de 98,68%, ou seja, das 1.135 amostras com resultado negativo no TPF, 1.120 foram classificadas como de animais não infectadas

A tabela 35 demonstra a comparação dos resultados do TPF e a condição verdadeira do animal, estabelecida pela combinação dos resultados dos testes oficialmente usados no Brasil (AAT, SAL+ME e RFC), sendo consideradas positivas as amostras suspeitas no TPF. Na tabela 36, as amostras suspeitas no TPF foram consideradas negativas. Dessa forma, foi observada uma coerência de resultados do TPF com a condição verdadeira do animal de 97,20% (tabela 35) e 98,18% (tabela 36). A sensibilidade relativa foi de 94,72%, com intervalo de confiança variando de 93,56% a 95,88%, com 95% de probabilidade, na situação da tabela 35, e na tabela 36, de 93,31%, com intervalo de confiança variando de 92,01% a 94,61%, com 95% de probabilidade. A especificidade do TPF foi maior (99,39%) quando as amostras suspeitas no TPF foram consideradas negativas (tabela 36) do que quando foram desconsideradas (99,38%) ou quando foram consideradas positivas (97,82%).

Tabela 33. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e da reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados*	Não Infectados**	
Positivo	265	7	272
Suspeito	4	18	22
Negativo	15	1.120	1.135
TOTAL	284	1.145	1.429

* Animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes AAT, SAL+ME e RFC

** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Tabela 34. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soraglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	265	7	272
Negativo	15	1.120	1.135
TOTAL	280	1.127	1.407

* Desconsiderando as amostras suspeitas no TPF

** Animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(265 / 280) \times 100 = 94,64\%$

Intervalo de confiança (95%) = {93,46% — 95,82%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.127) \times 100 \% = 99,38\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,97% — 99,79%}

Tabela 35. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroprecipitação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	269	25	294
Negativo	15	1.120	1.135
TOTAL	284	1.145	1.429

* Considerando as amostras suspeitas no TPF como positivas

** Animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(269 / 284) \times 100 = 94,72\%$

Intervalo de confiança (95%) = {93,56% — 95,88%}

Especificidade relativa = $(1.120 / 1.145) \times 100 \% = 97,82\%$

Intervalo de confiança (95%) = {97,06% — 98,58%}

Tabela 36. Resultados do teste de polarização fluorescente (TPF) em comparação com a condição verdadeira do animal (infectado ou não infectado), determinada pela combinação dos resultados dos testes do antígeno acidificado tamponado (AAT), interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroprecipitação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME) e reação de fixação de complemento (RFC), para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF*	AAT / SAL + ME / RFC		TOTAL
	Infectados**	Não Infectados***	
Positivo	265	7	272
Negativo	19	1.138	1.157
TOTAL	284	1.145	1.429

* Considerando as amostras suspeitas no TPF como negativas

** Animais com resultado positivo em pelo menos um dos testes AAT, SAL+ME e RFC

*** Animais com resultado negativo nos testes AAT, SAL+ME e RFC

Sensibilidade relativa = $(265 / 284) \times 100 = 93,31\%$

Intervalo de confiança (95%) = {92,01% — 94,61%}

Especificidade relativa = $(1.138 / 1.145) \times 100 \% = 99,39\%$

Intervalo de confiança (95%) = {98,99% — 99,79%}

O ponto de corte do TPF que proporcionou melhor combinação de sensibilidade e especificidade relativas foi 85,9 mP. Nesse ponto de corte, a sensibilidade relativa foi de 98,9% e a especificidade relativa foi de 98,6% (Tabela 37), quando o teste foi comparado com a condição verdadeira estabelecida pela combinação dos testes oficialmente adotados pela legislação brasileira.

Tabela 37. Sensibilidade (S), especificidade (E) e soma de ambas (S+E) obtidas, de acordo com o ponto de corte (PC), para o teste de polarização fluorescente, para o diagnóstico sorológico da brucelose suína, usando a combinação do teste do antígeno acidificado, teste do mercaptoetanol e reação de fixação de complemento para estabelecer a condição verdadeira.

PC (mP)	S	E	S+E	PC (mP)	S	E	S+E
69,8	100,0000	63,6681	163,6681	85,9 *	98,8506	98,6026	197,4532
78,5	99,6169	95,0218	194,6367	86,6	98,4674	98,6026	197,0701
78,8	99,6169	95,1965	194,8134	87,0	98,4674	98,6900	197,1574
78,9	99,6169	95,2838	194,9007	87,1	98,4674	98,7773	197,2447
79,0	99,6169	95,3712	194,9888	88,2	98,0843	98,7773	196,8616
79,1	99,2337	95,3712	194,6049	88,8	98,0843	98,8646	196,9489
79,8	99,2337	96,4192	195,6529	89,6	97,7011	98,8646	196,5658
79,9	99,2337	96,5066	195,7403	89,9	97,3180	98,8646	196,1826
80,1	99,2337	96,5934	195,8276	90,9	97,3180	99,0393	196,3573
80,5	99,2337	96,7686	196,0023	91,9	96,9349	99,0393	195,9742
80,6	99,2337	96,8559	196,0896	92,0	96,5517	99,0393	195,5910
80,7	99,2337	96,9432	196,1769	93,1	96,5517	99,1266	195,6784
81,5	99,2337	97,0306	196,2643	94,9	96,5517	99,2140	195,7657
81,7	99,2337	97,1179	196,3516	95,0	96,5517	99,3013	195,853
82,3	98,8506	97,1179	195,9685	95,9	95,7854	99,3013	195,0868
82,4	98,8506	97,2052	196,0558	96,0	95,0192	99,3013	194,3205
82,6	98,8506	97,4672	196,3178	96,6	95,0192	99,3886	194,4078
82,8	98,8506	97,5546	196,4052	97,3	94,6360	99,3886	194,0247
82,9	98,8506	97,6419	196,4925	97,7	94,2529	99,3886	193,6415
83,0	98,8506	97,7293	196,5798	97,8	93,8697	99,3886	193,2584
83,3	98,8506	97,8166	196,6672	97,9	93,8697	99,476	193,3457
83,6	98,8506	97,9913	196,8418	98,6	93,1034	99,476	192,5794
83,8	98,8506	98,0786	196,9292	99,4	93,1034	99,5633	192,6668
84,6	98,8506	98,1659	197,0165	101,5	92,7203	99,5633	192,2836
84,8	98,8506	98,2533	197,1038	101,6	92,3372	99,5633	191,9005
84,9	98,8506	98,3406	197,1912	103,8	90,8046	99,6507	190,4553
85,0	98,8506	98,4279	197,2785	128,8	77,3946	100,0000	177,3946

mP = unidades de milipolarização.

* Ponto de corte com a melhor combinação de sensibilidade e especificidade.

4.5 DISCUSSÃO

Um dos pontos mais importantes no diagnóstico é um histórico sanitário adequado do rebanho. Os bons registros das manifestações clínicas, da movimentação dos animais, da aquisição de novos animais, de doenças nas pessoas que trabalham com os animais fornecem informação inestimável, necessária para chegar ao diagnóstico confirmatório da brucelose. A informação epidemiológica exata é um suplemento essencial à análise laboratorial (MACMILLAN, 1999). A dificuldade em detectar todos os suínos infectados em um rebanho por meio dos testes sorológicos suporta a política de sacrifício de rebanhos infectados, sempre que praticável (FERRIS et al., 1995).

Os testes sorológicos constituem a base do diagnóstico em um programa sanitário para controle ou erradicação da brucelose animal, por proporcionarem uma alternativa que viabiliza o teste de um grande número de amostras. No entanto deve ser considerado que o diagnóstico sorológico está sujeito a erros, tanto pela ocorrência de resultados falso-positivos quanto pela ocorrência de resultados falso-negativos. O recurso adotado pelo PNCEBT, para o diagnóstico da brucelose em bovinos e bubalinos, foi a utilização de testes sorológicos em série, usando o teste do AAT na triagem, sendo a confirmação dos resultados positivos realizada pela combinação dos testes SAL+ME ou então pela RFC (BRASIL, 2006).

Esse procedimento tem o propósito de melhorar a especificidade do diagnóstico, de modo a minimizar a ocorrência de resultados falso-positivos, o que acarretaria o sacrifício desnecessário de um grande número de animais. Tratando-se da espécie suína, a Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece normas para certificação de granjas de reprodutores suídeos com base nas mesmas técnicas do PNCEBT.

A comparação entre todos os testes avaliados no presente estudo mostrou uma concordância ótima entre eles. O maior valor de kappa foi de 0,98, quando

comparadas as técnicas de RFC e a combinação de SAL+ME. Em contrapartida, o menor valor de kappa neste estudo foi de 0,83, obtido com a comparação dos resultados do TPF e do AAT-RIV, quando foram consideradas positivas as amostras com resultados suspeitos no TPF. Dados sobre testes sorológicos no diagnóstico da brucelose suína são escassos na literatura nacional e internacional e na sua maioria antigos, o que dificulta a comparação entre eles.

A comparação, no presente estudo, entre os testes adotados pelo PNCEBT (AAT, SAL+ME e RFC) mostrou uma concordância ótima entre o teste de triagem (AAT) e os testes confirmatórios (SAL+ME e RFC). Essa comparação apontou um coeficiente kappa de 0,96 e 0,97, quando o AAT foi comparado, respectivamente, com a RFC e a combinação SAL+ME, desconsiderando os resultados inconclusivos. Esta última, como se pode observar, apresentou a melhor concordância com o teste de triagem.

Entretanto devem-se destacar algumas ocorrências de resultado positivo no teste confirmatório em soros com resultado negativo no teste de triagem, o que mostra a possibilidade de resultado falso-negativo no procedimento adotado pelo PNCEBT. Resultados negativos no AAT e positivos em provas confirmatórias também já foram relatados em outros trabalhos (ARAUJO et al., 2003; GARCIA-CARRILLO et al., 1971), mas essa não é a situação esperada, pois um teste de triagem deve primar pela elevada sensibilidade, pois a ocorrência de resultados falso-negativos pode dificultar a erradicação da enfermidade, permitindo assim a permanência de animais infectados na granja

Como seria esperado, os testes confirmatórios do PNCEBT (SAL+ME e RFC) apresentaram melhor concordância entre si do que com o teste de triagem (AAT), uma vez que alguns soros com resultado positivo na triagem apresentam resultado negativo no teste confirmatório, como consequência da maior especificidade deste. A comparação de SAL+ME e RFC demonstrou uma concordância ótima, sendo observado um coeficiente kappa de 0,98, apresentando a melhor concordância do presente estudo, chegando muito próximo da concordância de kappa perfeita (1,00), segundo PEREIRA (2000), adaptado de Landis & Kock (1977). No entanto não se pode desconsiderar a

ocorrência de alguns resultados divergentes entre os testes confirmatórios, com soros apresentando resultado negativo em um teste e título no outro, indicando a possibilidade de obtenção de resultado falso-negativo nos testes confirmatórios.

Esses resultados concordam com a constatação feita por GARCIA-CARRILLO et al. (1971), o qual relataram que 11 suínos do total de 26 animais apresentaram alguma titulação na RFC e nenhuma reação no ME. Sendo assim, concluíram que a RFC não deve ser substituída pelo ME, como teste confirmatório no diagnóstico da brucelose suína, por não ter sido observada concordância adequada entre os resultados dos dois testes. A ocorrência de resultado negativo na RFC em soro com título na combinação SAL+ME, observada em uma amostra do presente estudo, poderia estar associada à presença de IgG2, a qual aglutina, mas não fixa complemento (PAULIN et al., 2002).

Resultados falso-positivos também podem ocorrer na RFC, acarretando dificuldades no diagnóstico da brucelose suína, pois certos soros podem interatuar com o complemento da cobaia, que é um dos reagentes usados na RFC (PRIADI et al., 1985, citado por FARRO et al., 2002). WRATHALL et al. (1993) relatam que alguns soros de suínos possuem aglutininas inespecíficas de tipo IgM que muitas vezes interferem com a especificidade das provas sorológicas.

De acordo com FERRIS et al. (1995), para diagnosticar a brucelose em suínos, devem-se preferencialmente usar testes independentes e baseados em diferentes princípios. A interpretação dos achados deve ser realizada em paralelo, a fim de aumentar a sensibilidade do diagnóstico.

Em relação ao teste AAT-RIV, um único trabalho, realizado com 1.061 bovinos, encontra-se na literatura. MEIRELLES (2008) apontou-o como um teste de elevada especificidade, que poderia ser útil como teste confirmatório para o diagnóstico da brucelose em bovinos. Foi observado que essa prova pode proporcionar resultados falso-negativos em amostras com baixa titulação nos testes de RFC e na combinação do SAL+ME. Naquele estudo, o teste apresentou concordância regular com o teste de triagem ($\kappa = 0,53$) e concordância boa com os testes confirmatórios. Na comparação com a combinação SAL+ME, o κ foi 0,66, e na comparação com a RFC, o coeficiente κ foi 0,76, ou seja,

o AAT-RIV apresentou melhor concordância com a RFC. No presente trabalho, realizado com soro suíno, o AAT-RIV demonstrou melhor concordância com os testes avaliados, classificadas todas como ótimas.

Comparando o AAT-RIV com o teste de triagem, o kappa foi 0,87, com a combinação SAL+ME o kappa foi 0,92 e na comparação com a RFC o coeficiente kappa foi 0,90, discordando novamente de MEIRELLES, pois na situação presente o AAT-RIV apresentou melhor concordância com a combinação SAL+ME e não com a RFC. Entretanto pode ser verificada a ocorrência de amostras negativas no AAT-RIV e positivas nos testes AAT, SAL+ME e RFC, demonstrando resultados falso-negativos pelo AAT-RIV em suínos, concordando com as observações feitas por MEIRELLES (2008) em seu trabalho com bovinos.

A menor concordância com o teste de triagem está relacionada com a elevada especificidade do AAT-RIV. Na comparação com os testes confirmatórios, observou-se que, geralmente, títulos elevados na RFC estão associados com resultado positivo no AAT-RIV. MEIRELLES (2008) constatou que apenas 3 dos 375 soros com resultado positivo no AAT-RIV apresentaram resultado negativo na RFC, mas destacou tratar-se de soros com resultado positivo e com títulos altos (200I, ≥ 400 , ≥ 400) no teste do ME, sugerindo que se tratava de soro de animal infectado e que havia a possibilidade de o resultado da RFC ser falso-negativo. O mesmo foi notado no presente estudo, em que se pôde constatar que 1 amostra não teve o resultado concordante entre estas duas provas, sendo importante frisar que essa única amostra foi positiva em todos os demais testes (AAT, SAL+ME, TPF) e negativa apenas na RFC, apresentando título igual a 100 no teste ME, 400 na SAL e 221,1mP no TPF, reforçando o indício de falha da RFC.

GARCIA-CARRILLO et al. (1971), avaliando os testes sorológicos em 26 porcas infectadas experimentalmente com *B.suis*, e das quais foi isolado o agente etiológico quando sacrificadas, 29 a 41 dias após a infecção, verificaram uma sensibilidade de 96,15% para a RFC, técnica 50% de hemólise, e de apenas 38,46% para o AAT, obtendo o maior valor de sensibilidade para a RFC e o menor para o ME, que foi positivo em 10 de 26 animais, e o rivanol, que identificou

apenas 6. Já o trabalho de ROGERS et al. (1989), que avaliaram os testes sorológicos usando animais naturalmente infectados e dos quais havia sido isolada *B.suis*, mostrou uma sensibilidade mais elevada (79,1%) para o AAT e mais baixa (49,1%) para a RFC, em comparação com o trabalho anteriormente citado. O mesmo foi observado por FERRIS et al. (1995), também estudando suínos naturalmente infectados, que verificaram sensibilidade de 67% e 57%, para os testes de AAT e RFC, respectivamente. MACMILLAN (1999) considera que as razões do valor insatisfatório da sensibilidade incluem cepas de *B.suis* com baixa imunogenicidade, variação no estágio da doença em uma granja suína infectada e exposição a pequena dose infectante de *B.suis*, com um prolongado período de incubação.

Os valores de sensibilidade observados no presente trabalho são superiores aos geralmente encontrados na literatura. Entretanto, PAYEUR et al. (1990), utilizando suínos experimentalmente infectados, observaram uma sensibilidade elevada (100%) para os testes AAT e RFC, e de 60% para o rivanol, nos estágios iniciais da infecção (21 dias), mas em estágios mais avançados (40 dias) a sensibilidade dos testes AAT e RFC caiu para 60%, e a do rivanol, para 20%. Os autores concluíram que devem ser usados vários testes sorológicos para se poder diagnosticar a brucelose suína. Com base na sensibilidade encontrada para os testes avaliados no presente estudo, pode-se concluir que estes (AAT, AAT-RIV, SAL+ME, RFC e TPF) apresentam boa sensibilidade, principalmente para detectar brucelose no rebanho.

A especificidade foi calculada pela proporção de resultados negativos obtidos ao testar os animais procedentes de rebanhos livres, cujo soro sanguíneo foi colhido em frigorífico do Estado de São Paulo. Sendo assim, foram obtidos os seguintes valores de especificidade para os testes avaliados: 100% para a RFC, para a combinação SAL+ME e para o AAT-RIV, 99,27% para o AAT e 99,55% para o TPF quando as amostras classificadas como suspeitas foram consideradas negativas. Quando essas amostras suspeitas no TPF foram desconsideradas, o valor da especificidade da RFC (100%), da combinação do SAL+ME (100%), do

AAT-RIV (100%) e do AAT (99,27%) manteve-se o mesmo, mas o do TPF mostrou-se um ligeiramente inferior, 99,54%.

Outros autores observaram especificidade não tão elevada para esses testes sorológicos. Usando suínos dos quais não foi possível isolar *B.suis*, ROGERS et al. (1989) constataram especificidade de 81% para a SAL, 81,2% para o AAT e 90,8% para a RFC, enquanto FERRIS et al. (1995) verificaram especificidade de 62%, 92% e 94% para os mesmos testes, respectivamente. No entanto, ROGERS et al. (1989) ressaltaram que, devido à dificuldade de detectar todos os infectados por meio das técnicas de cultivo do microrganismo, as comparações com os testes sorológicos devem ser interpretadas com cautela, principalmente em animais naturalmente infectados, pois, nesse caso, a cultura do microrganismo é um indicador menos sensível do que em animais infectados experimentalmente. Desta forma, a especificidade do teste sorológico seria provavelmente subestimada quando calculada pela comparação de seus resultados com os resultados do cultivo bacteriológico. Reforçando essa afirmação, esses autores analisaram exames realizados no período de 1977 a 1986, em Queensland, Austrália, e verificaram a ocorrência de 758 resultados positivos no teste AAT entre 31.326 animais de rebanhos livres da infecção, o que resulta em um valor de 97,6% para a especificidade do teste, em comparação com o valor de 81,2% observado pelos mesmos autores em animais negativos no cultivo. A afirmação desses autores corrobora a elevada especificidade observada para os testes sorológicos avaliados no presente trabalho.

Para a interpretação dessas divergências entre os valores de sensibilidade e especificidade observados, é importante considerar também que há variações nas técnicas utilizadas pelos diversos autores, principalmente em relação à RFC, e que os valores obtidos são válidos para a situação estudada, não podendo ser considerados valores universais, para todas as situações, conforme salientam MARTIN et al. (1987). No caso da especificidade, é importante considerar a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com outros microrganismos, principalmente *Yersinia enterocolitica* O9, cuja infecção pode dar origem a

resultados falso-positivos (WRATHALL et al., 1993). A avaliação de um teste nessas condições, obviamente, resultaria em menor especificidade.

Todos os valores de sensibilidade, especificidade e concordância entre os testes avaliados observados são superiores aos geralmente encontrados na literatura, talvez pela variação das técnicas utilizadas nos diversos estudos citados e pela origem das amostras, pois neste trabalho estudou-se um rebanho na fase aguda de um foco natural de brucelose, e em muitos outros estudos foram utilizadas amostras de animais experimentalmente infectados ou de situações de infecções naturais crônicas.

A maneira ideal de determinar a sensibilidade de um teste de diagnóstico sorológico da brucelose seria pela análise de amostras de animais dos quais tivesse sido isolado o agente etiológico. Entretanto esse material é de difícil obtenção, e a alternativa mais prática consiste na determinação da sensibilidade relativa, na qual se usam, para estabelecer a condição de infectado, procedimentos biologicamente similares ao do teste que está sendo avaliado. Não se deve, porém, ignorar que essa metodologia apresenta inconvenientes, pois resultado falso-negativo em um dos testes usados como parâmetro acarreta descarte de amostra de animal infectado, restando apenas as amostras com resultado positivo em todos os testes padrões, o que pode acarretar distorções na determinação da sensibilidade do teste que está sendo avaliado.

Da mesma forma, para a determinação da especificidade, o ideal seria o uso de amostras provenientes de rebanhos livres da infecção, localizados em áreas onde a brucelose esteja erradicada. Quando não se dispõe desse material, a opção é determinar a especificidade relativa, usando soros com resultado negativo nos testes que serviram de padrão, o que também pode acarretar distorções.

De acordo com NIELSEN & GALL (2001), um dos problemas frequentemente encontrados na validação de novos testes pela comparação com testes em uso, e geralmente com desempenho inferior, é que se considera o resultado do novo teste errado, em favor do teste mais antigo.

No presente trabalho, foram calculadas também a sensibilidade e a especificidade relativas dos testes avaliados, comparando seus resultados com a combinação dos resultados de outros testes. O AAT apresentou soma dos valores de sensibilidade e especificidade superior à da RFC e à do SAL+ME, 199,61%, 199,22% e 198,84%, respectivamente. O AAT, quando comparado com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados do teste RFC, TPF e a combinação SAL+ME, resultou em um valor de sensibilidade igual a 99,61%. Já a combinação SAL+ME, em comparação com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados dos testes AAT, RFC e TPF, resultou em um valor de sensibilidade igual a 99,22%. A RFC, quando comparada com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados dos testes AAT, TPF e combinação SAL+ME, resultou em 98,84% de sensibilidade. Na literatura geralmente são encontrados valores de sensibilidade inferiores aos do presente estudo. GARCIA-CARRILLO et al. (1971), ROGERS et al. (1989) e FERRIS et al. (1995) verificaram respectivamente para o AAT 38,46%, 79,1% e 67%, e para a RFC 96,15%, 49,1% e 57%. Entretanto PAYEUR et al. (1990) observaram 100% de sensibilidade para ambos os testes (AAT e RFC).

Em relação à especificidade relativa dos testes AAT-RIV, SAL+ME e RFC, todos apresentaram 100% quando seus resultados foram comparados com a combinação dos resultados dos outros testes. ROGERS et al. (1989) e FERRIS et al. (1995) constataram, para o AAT, valores inferiores aos do presente estudo: 81,2% e 92%, respectivamente. Para SAL+ME eles verificaram valores iguais a 81% e 62%, respectivamente. A RFC apresentou 90,8% no estudo de ROGERS et al. (1989) e 94% no de FERRIS et al. (1995).

Os resultados do presente trabalho apontaram uma sensibilidade relativa do AAT-RIV de 88,12% (86,43% a 89,81%, com 95% de confiança) e uma especificidade relativa de 100%, quando esse teste foi comparado com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados dos testes oficialmente adotados no Brasil (AAT, SAL+ME, RFC), considerando infectados os animais com resultado positivo em todos os testes e não infectados os animais

com todos os resultados negativos. Observou-se que 97,8% dos resultados do teste foram concordantes com a condição verdadeira. Entretanto, quando o AAT-RIV foi comparado com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos mesmos testes considerando infectados os animais com resultado positivo em pelo menos um teste oficial, sua sensibilidade caiu para 81,34% (79,32% a 83,36%, com 95% de confiança), mantendo sua especificidade (100%). Nesse caso, 96,29% dos resultados concordaram com a condição verdadeira.

A alta especificidade e a sensibilidade comparativamente mais baixa podem ser explicadas pelo fato de a ação do rivanol provocar a precipitação de imunoglobulinas da classe IgM, que estão mais associadas a aglutinações inespecíficas. Além disso, o baixo pH do antígeno também torna esse teste de aglutinação mais específico, conforme observaram ROSE & ROEPKE (1957).

Uma vez que não há na literatura outro estudo avaliando o AAT após tratamento do soro suíno com rivanol (AAT-RIV), não há como comparar a sensibilidade e a especificidade observadas no presente trabalho. MEIRELLES (2008) relata valores da comparação entre os resultados do AAT-RIV e a condição verdadeira em bovinos, estabelecida pela combinação dos resultados das provas AAT, SAL+2-Me e RFC. Essa comparação resultou em uma sensibilidade relativa de 76,5%, com intervalo de confiança (95%) de 72,7% a 80,3%, e especificidade relativa de 100%. Esse autor concluiu que o AAT-RIV poderia ser utilizado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina, sendo os animais com resultado positivo considerados infectados, e aqueles com resultado negativo submetidos a um dos dois testes confirmatórios adotados pelo PNCEBT.

Comparando os resultados com aqueles obtidos com o teste do rivanol, que é a soroaglutinação rápida em placa após o tratamento do soro com esse produto, pode-se deduzir que o AAT-RIV apresentou menor sensibilidade e maior especificidade, já que FERRIS et al. (1995) verificaram sensibilidade de 58% (com valores variando de 43% a 73%) e especificidade de 95% (com valores variando de 92% a 99%) para o teste do rivanol. PAYEUR et al. (1990) observaram, para o teste do rivanol, sensibilidade variando de 60% a 20% em animais que haviam

sido expostos à infecção há 21 e 40 dias, respectivamente, e especificidade de 100% em ambos os casos, concordando com CEDRO et al. (1977), que relatam uma especificidade também de 100% em seu estudo.

Os resultados observados no presente trabalho mostraram que o AAT-RIV é um teste altamente específico e que pode fornecer alguma contribuição ao diagnóstico sorológico da brucelose suína. Essa contribuição consistiria na aplicação desse teste como prova confirmatória, em soros positivos no teste de triagem, porém antes de serem submetidos aos testes confirmatórios (SAL+ME ou RFC). Esses testes são laboriosos, complexos e demorados, o que retarda a obtenção do resultado final e limita o número de laboratórios que podem realizar o diagnóstico confirmatório. A inserção do AAT-RIV recomendada por MEIRELLES (2008) no esquema de diagnóstico da brucelose em bovinos poderia ser aplicada a suínos e constituiria uma opção rápida e de baixo custo para a confirmação dos resultados positivos no teste de triagem, sem maiores necessidades de recursos laboratoriais, exigindo, em relação à infraestrutura de que já dispõe o veterinário habilitado, apenas o acréscimo de uma centrífuga.

O AAT-RIV poderia ser realizado nas amostras positivas no AAT, e os resultados positivos no AAT-RIV poderiam ser considerados indicadores de infecção, uma vez que a elevada especificidade do teste confere a ele maior valor preditivo positivo. Amostras positivas no AAT e negativas no AAT-RIV seriam então submetidas a um dos dois testes confirmatórios, para a conclusão do diagnóstico. Com isso, haveria barateamento do diagnóstico, maior rapidez na obtenção do resultado e, portanto, na adoção da medida sanitária para a redução da taxa de prevalência da infecção.

O TPF foi avaliado em soro de suínos em dois trabalhos, realizados um no Canadá e outro na Argentina, não existindo, dessa forma, muitos resultados para serem comparados. No presente trabalho, a melhor concordância desse teste foi com os testes confirmatórios SAL+ME e RFC; em ambos os casos o valor de kappa foi igual a 0,96. O TPF demonstrou ótima concordância quando comparado com o AAT (0,94) e o AAT-RIV (0,87), embora o último teste tenha apresentado a menor concordância quando comparado com o TPF. Diversos autores, em

pesquisas com bovinos (NIELSEN et al., 1998; SAMARTINO et al., 1999; DAJER et al., 1999; McGIVEN et al., 2003) e suínos (NIELSEN et al., 1999; SILVA PAULO et al., 2000), observaram que o teste apresenta a capacidade de combinar elevada sensibilidade com elevada especificidade.

Em uma das condições avaliadas, o valor da sensibilidade relativa (93,31%) mostrou-se próximo aos descritos na literatura, 93,50% por NIELSEN et al. (1999), no Canadá, e 93,80% por SILVA PAULO et al. (2000), na Argentina. Nas outras situações os resultados foram superiores aos descritos pelos mesmos autores, variando de 94,64% a 98,85%, dependendo da situação analisada. Quando foi adotado um ponto de corte fixo, 85,9 mP, a sensibilidade foi 98,85%, superior à observada por aqueles autores, que também interpretaram os resultados usando um ponto de corte fixo, 84,7 mP (NIELSEN et al., 1999) e 87,7 mP (SILVA PAULO et al., 2000).

Quando o TPF foi comparado com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados do AAT, SAL+ME e RFC, a especificidade relativa, que variou de 97,82% a 99,39%, mostrou-se próxima à encontrada por NIELSEN et al. (1999), 97,2%, e por SILVA PAULO et al. (2000), 98,3%. Com o ponto de corte fixo, a especificidade de 98,6% também esteve bastante próxima daquela observada por aqueles autores.

Os resultados mostraram que o TPF apresentou bom desempenho no diagnóstico sorológico da brucelose suína e que o mesmo pode ser bastante útil se adotado como teste oficialmente aceito no Brasil. Além desse bom desempenho, o teste apresenta outras vantagens, como a facilidade e a rapidez de realização, além do fato de não estar sujeito a situações que podem levar a erro de diagnóstico, como o efeito prozona e a ocorrência de atividade anticomplementar, no caso da RFC. Apesar disso, não se pode esquecer que o custo maior e a dificuldade de obtenção do reagente importado podem ser fatores que limitam sua utilização em áreas carentes de recursos financeiros.

4.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as conclusões que se seguem.

- O teste da polarização fluorescente (TPF) demonstrou bom desempenho, em todas as situações consideradas, com elevada sensibilidade e especificidade, apresentando-se promissor para o diagnóstico da brucelose suína. Devido a essas qualidades, o TPF poderia ser utilizado como teste único. Apesar do custo mais elevado, o uso seria vantajoso, especialmente em rebanhos suínos com alto valor zootécnico (granjas de reprodutores).

- Embora o teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) tenha apresentado menor sensibilidade do que os outros testes avaliados - antígeno acidificado tamponado (AAT), soroaglutinação lenta e mercaptoetanol (SAL+ME), fixação de complemento (RFC) e TPF - trata-se de um teste com 100% de especificidade. Desta forma, poderia ser utilizado como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose suína, sendo os animais com resultado positivo considerados infectados, e aqueles com resultado negativo submetidos a um dos dois testes confirmatórios adotados pela legislação (SAL+ME- e RFC). Vale ressaltar que se trata de uma alternativa rápida e barata.

- Observou-se concordância ótima entre o teste de triagem (AAT) e os testes confirmatórios (SAL+ME e RFC) adotados pela legislação brasileira. Como seria esperado, os testes confirmatórios apresentaram melhor concordância entre si do que com o teste de triagem.

- O AAT apresentou soma de sensibilidade e especificidade superior à da RFC e à do SAL+ME. A soma de sensibilidade e especificidade dos três testes apresentou pouca diferença.

- A comparação entre todos os testes avaliados no presente estudo mostrou uma concordância ótima entre eles. A melhor concordância foi observada entre RFC e SAL+ME, e a pior foi entre TPF e AAT-RIV.
- Os testes (AAT, AAT-RIV, SAL+ME, RFC e TPF) apresentaram excelente desempenho para detectar brucelose suína no rebanho.

4.7 REFERÊNCIAS*

ABALOS, P.; IBARRA, L.; PINOCHET, L.; NAVIA, F.; BOISIER, X. Residual anti-*Brucella* strain 19 antibodies detected in adult cattle by two indirect-ELISA tests. **Veterinary Record**, v.138, p.140, 1996.

ABIMERHI, D.; GUTIÉRREZ, A.F.; VILLALOBOS, E.J. Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México. **Veterinária México**, v.29, n.2, p.167-171, 1998.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales**. v.1. Bacteriosis y Micosis. 3 ed. Washington: OPS, 2001. 398 p.

AKKERMANS, J.P.W.M; HILL, K.W. *Yersinia enterocolitica* serotype 9 infection as a factor interfering with the serodiagnosis of *Brucella* infection of in swine. **Netherlands Journal Veterinary Science**. v.5, n.1, p.73-80, 1972.

ALTON, G.G. *Brucella suis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN J.R. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, CRC Press, p.411-422, 1990.

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 test. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n.2, p.57-63, 1975.

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. 190p.

ARAUJO, L.V.; RAMOS, A.C.F.; FRAGUAS, S.A.; CARDOSO, V.S., GOMES, R.P.; SIQUEIRA, C.C.; LILENBAUM, W. Comparação de métodos sorológicos para diagnóstico da brucelose em suínos de criação tecnificada do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.25, n.2, 2003.

BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Veterinary Quarterly**, v.20, n.3, p.81-88, 1998.

BOCKEMUHL, J.; ROTH, J. *Brucella* – titer bei subklinischen infektionen mit *Yersinia enterocolitica* O:9 in einem schweine – zuchtbetrieb. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg**, v.240, p.86-93, 1978.

* De acordo com as normas da ABNT-NR 6023

BRANDON, M.R.; WATSON, D.C; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v.49, p.613-623, 1971.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 19, de 19 de fevereiro de 2002. Aprova as Normas a serem cumpridas para a certificação de Granjas de Reprodutores Suídeos. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de março de 2002. p.3-4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 6, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2004a. Seção 1, p. 6-10.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. Aprova o regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF, 24 de março de 2004b. Seção 1, p. 25-26.

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

BRICKER, B.J. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.433-434, 2002.

CEDRO, V.C.F.; CASAS-OLASCOAGA, R.; GARCÍA-CARRILLO, C.; GONZÁLEZ-TOMÉ, J.; BAGNAT, E.; ZAGO, A. Brucellosis experimental en porcinos. III. Determinación de la dosis infectante de una cepa atípica de *Brucella suis* y evaluación de la respuesta serológica. **Revista Medicina Veterinária**. v.58, n.3, p.2-8, 1977.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, OPS/OMS. **Pruebas Suplementarias para el Diagnostico de la Brucelosis**. Buenos Aires: Ramos Mejía, Nota Técnica, n.25, 1982.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.

CORBEL, M.J. **Brucellosis in humans and animals**. WHO Press. Genebra, p.22-35, 2006.

CORNER, L.A.; ALTON, G.G.; MCNICHOL, L.N.; STREETENS, T.; TRUEMEN, 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.

DAJER, A.; LUNA-MARTÍNEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIÉRREZ, E.; PEÑA, G.; GURRÍA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis en México. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, n.1, p.67-73, 1999.

DEYOE, B.L. Diagnostic tests for swine brucellosis. **Proceedings of the 53th Annual Meeting Livestock Conservation**, p.20-22, 1969.

DEYOE, B.L. Brucellosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 6th ed. Iowa State University Press: Ames, p. 599-607, 1986.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. Charlottetown: AVC Inc., 2003. 706 p.

FALCÃO, D.P.; GIORGI, W.; IMBRIANI, E.M.M; SENTOME, E.H.T.; PINCETTA, L.A. *Yersinia enterocolitica*: inquérito sorológico em suínos. **Biológico**. v.46, n.12, p.295-301, 1980.

FARRO, D.R., FALCÓN, N.P., MANCHEGO, A.S., RIVERA, H.G. Frecuencia de *Brucella* sp. en porcinos, procedentes de granjas tecnificadas y no tecnificadas, beneficiados en dos mataderos de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v.13, n.2, p.72-77, 2002.

FERRIS, R.A.; SCHOENBAUM, M.A.; CRAWFORD, R.P. Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.207, n.10, p.1332-1333, 1995.

FINLAY, R.C.; ROE, R.T.; KELLAR, J.A. National swine brucellosis survey. **The Canadian Veterinary Journal**. v.28, n.11, p.714-716, 1987.

FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W.; JOHNSON, W.O.; HIETALA, S.K.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J. Comparison of serologic test for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.11, p.1598-1605, 2002.

GALL, D.; NIELSEN, K.; FORBES, L.; DAVIS, D.; ELZER, P.; OLSEN, S.; BALSEVICIUS, S.; KELLY, L.; SMITH, P.; TAN, S.; JOLY, D. Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. **Journal of Wildlife Diseases**, v.36, p.469-476, 2000.

GARCÍA-CARRILLO, C.; CEDRO, V.C.F.; BENEDETTI, L.M.E. Brucellosis experimental en porcinos. II. Evaluación de técnicas serológicas en credos con infección reciente de *Brucella suis*. **Revista de Investigaciones Agropecuarias. Série 4. Patologia Animal**, v.8, n.4, p. 99-107, 1971.

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

HUBER, J.D.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.7, p.1529-1531, 1986.

JACOBSON, R.H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue Scientifique et Technique**. OIE., v.17, n.2, p.469-486, 1998.

JIMENÉZ DE BAGÜÉS, M.P.; MARÍN, C.M.; BLASCO, J.M.; MORRIÓN, I.; GAMAZO, C. An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B.melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B.melitensis* strain Rev 1 vaccination. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.233-241, 1992.

LANDIS, J.R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p. 159-174, 1977.

LORD, V.R.; LORD, R.D. *Brucella suis* infections in collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in Venezuela. **Journal of Wildlife Diseases**, v.27, n.3, p.477-481, 1991.

LORD, V. R.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; MARCANO, M. J.; MELENDEZ, G. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.1, p. 295-297, 1997.

LUCERO, N.E.; ESCOBAR, G.I.; AYALA, S.M.; SILVA PAULO, P.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.883-887, 2003.

LUNA-MARTÍNEZ, J.E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.19-30, 2002.

MACMILLAN, A. P. *Brucellosis*. In: LEMAN, A.D.; STRAW B.E.; MENGELING W.L.; D'ALLAIRE S.; TAYLOR D.J. **Diseases of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press: Ames, p. 385-393, 1999.

MARIÑO, J.; GALLEGO, 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.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. **Veterinary Epidemiology**. Ames: Iowa State University Press, 1987. 343 p.

MATHIAS, L.A.; PINTO, A.A. Serological diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): comparison among complement fixation, serum agglutination and rose Bengal test. **International Journal of Zoonosis**, v.10, p.122-126, 1983.

MATHIAS, L.A.; MACMILLAN, A.P.; GREISER-WILKE, I.; MOENNING, E.V. Comparação entre a reação de fixação de complemento, teste imunoenzimático indireto e teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos procedentes de rebanhos com histórico da enfermidade. **Ars Veterinária**, v.11, n.1, p.47-55, 1995.

McGIVEN, J.A.; TUCKER, J.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; BREW, S.D.; MACMILLAN, A.P. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle and comparison to SAT, CFT, and iELISA **Journal of Immunological Methods**, v.278, p.171-178, 2003.

MEIRELLES, R.B. Avaliação do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. 2008. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MITTAL, K.R.; TIZARD, I.R. Agglutination test and their modifications in the diagnosis of bovine brucellosis. **Compendium of Immunology and Microbiology of Infectious Diseases**, v.6, p.1-8, 1983.

MOREIRA, W.S.; FLORES, M.L.; SILVEIRA. Comparação de seis provas sorológicas, em suínos, no diagnóstico da brucelose. **Revista do Centro de Ciências Rurais**. v.18, n.3-4, p.249-254, 1988.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.31-38, 2002.

NAVARRO, F.; GREGORET, R.; BIDONDE, J.; SAMARTINO, L. Determination of the serological prevalence of bovine brucellosis in the county of Tandil, Argentina. **Revista de Medicina Veterinária**, Buenos Aires, v.78, n.5, p.311-314, 1997.

NERI, A.F.; ALDAY, J.R.; CASANOVA, L.G. Prevalência de brucelosis em tres municipios del sur de Tamaulipas. **Técnicas Pecuárias de México**, v.31, n.2, p.97-101, 1993.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedure used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.10, p.1811-1816, 1969.

NICOLETTI, P.; TANYA, V. Comparison of enzyme-labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp-infected cows in herds with brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, n.12, p.1975-1977, 1993.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by sorology. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.447-459, 2002.

NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.22, p.183-201, 2001.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, N.; LEISHMEN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*, **Journal of Immunological Methods**, v.195, n.1 e 2, p.161-168, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L.; PEREZ, B.; COATS, M.; HENNAGER, S.; DAJER, A.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.66, p.321-329, 1998.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; VIGLIOCCO, A.; PEREZ, B.; SAMARTINO, L.; NICOLETTI, P.; DAJER, A.; ENRIGHT, F. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.68, p.245-253, 1999.

OIE. World Organization for Animal Health. **Porcine Brucellosis**. In: _____. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6 ed. Paris: OIE, 2009. Disponível em: < http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.0_8.05_PORCINE_BRUC.pdf >. Acesso em 05 de junho de 2010.

PAULIN, L.M.S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.4, p.41-47, 2002.

PAULIN, L.M.; FERREIRA, J.S. **Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. Funep, Jaboticabal, 2003.154p.

PAYEUR, J. B.; MILLER, C.D.; HENNAGER, S. G. ; EWALT, D. R. Comparison of five serologic tests and culture for brucellosis in swine experimentally infected with *Brucella suis* biovar 1. **Proceedings of the 94th Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.94, p.147-152, 1990.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia**. Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 596 p.

PEREZ FRANCO, J.; GARCIA-CARRILLO, C. Encuesta sorológica de brucellosis en cerdos sacrificados em Buenos Aires, Argentina. **Revista de Medicina Veterinária**, v.51, p.5-10, 1970.

RAFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.81-110, 2002.

RANGAN, V.E. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.11-18, 2002.

ROGERS, R.J. ; COOK, D.R.; KETTLERER, P.J.; BALDOCK, F.C.; BLACKALL, P.J.; STEWART, R.W. An evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella suis* in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v.66, p.77-80, 1989.

ROSE, J.E.; ROPKE, 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.

SALES HENRIQUES, H.L.R.; HUESTON, W.D.; HOBLET, K.H.; SHULAW, W.P. Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccination in adult sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v.13, p.205-215, 1992.

SAMARTINO, L.; GREGORET, R.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v.20, p.115-126, 1999.

SHANDU, K.S.; JOSHI, D.V. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v.36, n.4, p.458-465, 1993.

SILVA PAULO, P.; VIGLIOCCO, A.M.; RAMONDINO, R.F.; MARTICORENA, D.; BISSI, E.; BRIONES, G.; GORCHS, C.; GALL, D.; NIELSEN, K. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.7, p.828-831, 2000.

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.

TAMAYO, R.C.; GÓMEZ, P.P.; GALLEGUILLOS, H.V. Vigilancia de brucelosis bovina en una planta faenadora. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.12, n.1, p.35-40, 1997.

THORNER, R.M.; REMEIN, Q.R. **Principles and Procedures in the Evaluation of Screening for Disease**. Washington D.C.: United States Government Printing Office, 1961. 24 p. (Public Health Monograph, 67).

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. Hagan and Bruener's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. **Comstock Publishing Associates**. Division of Cornell University Press, 1988.

WRATHALL, A.E.; BROUGHTON, E.S.; GILL, K.P.W.; GOLDSMITH, G.P. Serological reaction to *Brucella* species in British pigs. **Veterinary Record**. v.132, p.449-454, 1993.

ZAMBRANO, A.J.; CHIRIGUAYO, B.A.; VILLALVA, F.M.; LOOR, K.A. Efficacy of reduced dose in vaccination of adult cattle in herds infected with brucellosis, In: Frank, J. F. (Ed.) **Networking in Brucellosis Research. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network**, Tokyo, United Nation University Press, 1991, p.97-105.

APÊNDICES

Apêndice 1. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	270	14	284
Negativo	2	1.147	1.149
TOTAL	272	1.161	1.433

$K = 0,93$

Apêndice 2. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	264	20	284
Negativo	1	1.148	1.149
TOTAL	265	1.168	1.433

$K = 0,95$

Apêndice 3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	269	15	284
Negativo	29	1.120	1.149
TOTAL	298	1.135	1.433

$K = 0,91$

Apêndice 4. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	265	19	284
Negativo	10	1.139	1.149
TOTAL	275	1.158	1.433

$K = 0,94$

Apêndice 5. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	231	0	231
Negativo	41	1.161	1.202
TOTAL	272	1.161	1.433

K = 0,90

Apêndice 6. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	231	0	231
Negativo	34	1.168	1.202
TOTAL	265	1.168	1.433

K = 0,92

Apêndice 7. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	228	3	231
Negativo	70	1.132	1.202
TOTAL	298	1.135	1.433

$K = 0,83$

Apêndice 8. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol (AAT-RIV) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

AAT-RIV	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	225	6	231
Negativo	50	1.152	1.202
TOTAL	275	1.158	1.433

$K = 0,87$

Apêndice 9. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	266	5	271
Negativo	6	1.156	1.162
TOTAL	272	1.161	1.433

$K = 0,97$

Apêndice 10. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos na combinação SAL+ME, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	262	9	271
Negativo	3	1.159	1.162
TOTAL	265	1.168	1.433

$K = 0,97$

Apêndice 11. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando positivos os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	267	31	298
Negativo	5	1.130	1.135
TOTAL	272	1.161	1.433

K = 0,92

Apêndice 12. Comparação entre os resultados obtidos por meio do teste de polarização fluorescente (TPF) e da interpretação da combinação dos resultados dos testes de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL+ME), considerando negativos os resultados inconclusivos da combinação SAL+ME e os suspeitos do TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

TPF	SAL+ME		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	259	16	275
Negativo	6	1.152	1.158
TOTAL	265	1.168	1.433

K = 0,95

Apêndice 13. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando positivos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	266	5	271
Negativo	32	1.130	1.162
TOTAL	298	1.135	1.433

K = 0,92

Apêndice 14. Comparação entre os resultados obtidos por meio da reação de fixação de complemento (RFC) e do teste de polarização fluorescente (TPF), considerando negativos os resultados suspeitos no TPF, para diagnóstico sorológico de brucelose em suínos.

RFC	TPF		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	263	8	271
Negativo	12	1.150	1.162
TOTAL	275	1.158	1.433

K = 0,95