

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL**

**BRUCELOSE BOVINA EM MATADOURO COM SERVIÇO DE INSPEÇÃO  
FEDERAL E MUNICIPAL NO ESTADO DO MARANHÃO**

**ANNA KAROLINE AMARAL SOUSA**

São Luís

2017

**ANNA KAROLINE AMARAL SOUSA**

**BRUCELOSE BOVINA EM MATADOURO COM SERVIÇO DE INSPEÇÃO  
FEDERAL E MUNICIPAL NO ESTADO DO MARANHÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado à  
Coordenação do Mestrado Profissional em Defesa  
Sanitária Animal, do Curso de Medicina Veterinária,  
da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA  
para obtenção do Título de Mestre em Defesa  
Sanitária Animal.

**Área de Concentração:** Sanidade Animal

**Orientador:** Dr. Hamilton Pereira Santos

**Co-Orientador:** Dr<sup>a</sup> Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

São Luís

2017

Sousa, Anna Karoline Amaral.

Brucelose bovina em matadouro com serviço de inspeção federal e municipal no estado do Maranhão / Anna Karoline Amaral Sousa. – São Luís, 2016.

64 f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos.

1. Brucella abortus. 2. Bovinos. 3. Doença ocupacional. 4. Zoonose.

I. Título.

CDU 636.2:616.993(812.1)

**ANNA KAROLINE AMARAL SOUSA**

**BRUCELOSE BOVINA EM MATADOURO COM SERVIÇO DE INSPEÇÃO  
FEDERAL E MUNICIPAL NO ESTADO DO MARANHÃO**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Hamilton Pereira Santos

Orientador

---

Profª. Drª. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

Co - Orientadora

---

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

1º Membro

---

Danilo Cutrim Bezerra

2º Membro

SÃO LUIS

2017

Dedico esta conquista á minha família que foram os maiores incentivadores na busca da realização deste sonho e os quais me apoiaram incondicionalmente, com uma paciência incrível e me ofereceram toda segurança necessária nos momentos difíceis me ajudando a não desistir nunca.

“Nunca tenha certeza de nada, por que a sabedoria começa com a dúvida. ”

Freud

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por me possibilitar realizar este sonho e por minha vida.

Ao meu marido Bruno Guimarães por seu amor e apoio incondicional, às minhas filhas Anna Beatriz e Anna Cristina Guimarães por toda a compreensão comigo durante todo esse período, a minha mãe Vilany Amaral por sua paciência e orações.

Aos meus sogros Wivanilson e Amália Guimarães e aos cunhados Thiago Guimarães, (por estar sempre disponível a me auxiliar com tudo do projeto) e Diego Guimarães e a cunhada Luiza Fonseca por todo suporte em inglês e pelo carinho.

A Andrea Vidal por sua amizade, alto astral.

Ao meu orientador Prof. Hamilton Santos, por sua dedicação, orientação e por estar sempre disposto a me ajudar quando precisei. A Nancyleni Bezerra por seu apoio e orientação, amizade e atenção, sem as quais não teria conseguido realizar esse sonho.

Ao Prof. Dr. Raimundo Rabelo, pelas palavras de amigo e ajuda em todos os momentos meu eterno e especial agradecimento por tudo e em especial por obter sua amizade. A Patrícia Müller, Alzira Medlig, Raimundo Tavares, Ariane Amorim e Helmy Lucena pela amizade e ajuda de vocês durante a pesquisa, sem vocês eu não teria conseguido. A Priscila Alencar, Pablo Sousa, Thais Bastos, Carol Torres, Juliana Alves, Amanda, Leny, Karllaylle, Naylla, Leo, Felipe e Diego Soares, membros do grupo do Laboratório de Doenças Infecciosas por toda ajuda e apoio durante as análises. A Hugo Napoleão Filho, Alessandra Pontes, Ana Claudia Macedo, Amélia Soraya e Socorro Lima por terem me auxiliado quando eu mais precisei. Aos amigos Zaira Barros, Juciele Oliveira, Geane Carvalho, por fazerem parte da minha vida durante toda a trajetória do mestrado. Ter vocês ao meu lado foi um grande presente de Deus.

A AGED, a UEMA, ao Laboratório de Doenças Infecciosas, ao curso de Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal, e a todos dos estabelecimentos que me abriram as portas e me possibilitaram realizar este trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Área de estudo .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 População estudada .....</b>	<b>32</b>
<b>5.3 Amostragem .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4 Coleta de dados .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4.1 Coleta e envio de amostras .....</b>	<b>33</b>
<b>5.5 Testes diagnósticos .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5.1 - AAT .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5.2 - 2 ME .....</b>	<b>36</b>
<b>5.6 Questionário .....</b>	<b>39</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade. Teste de soroglutinação lenta (UI/ml) Teste do 2-ME (UI/ml). .....	38
Quadro 2 – Interpretação do teste do 2-ME para machos e para fêmeas com idade superior a oito meses, vacinadas com RB51 ou não vacinadas Teste de soroglutinação lenta (UI/ml) Teste do 2-ME (UI/ml).....	38
Quadro 3 – Quantidade de amostras analisadas de acordo com o município, o serviço de inspeção e os resultados da sorologia.....	40
Quadro 4 - Resultado sorológico das amostras de soro bovino submetidas aos testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e ao teste do 2 Mercaptoetanol (2-ME) de acordo com a origem no período de outubro de 2015 a setembro de 2016. .....	40
Quadro 5 – Resultados sorológicos de amostras séricas de machos e fêmeas por município de origem.....	43
Quadro 6 - Total machos e fêmeas amostradas de acordo com o Serviço de Inspeção e Município de origem .....	44
Quadro 7 – Resultados sorológicos das amostras de soro bovino de acordo com o Serviço de Inspeção nos matadouros e municípios de origem .....	44
Quadro 8 - Fatores de risco associados à brucelose em bovinos abatidos em matadouros com SIF e SIM Nas regionais de Açailândia e Imperatriz.....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mapa do Maranhão .....	20
Figura 02: Mapa dos municípios da regional de Imperatriz e Açailândia .....	21
Figura 03: Mapa dos municípios da regional de Açailândia .....	30
Figura 04: Mapa dos municípios da regional de Imperatriz .....	31
Figura 05: Acondicionamento das amostras de soro bovino e de bolsas serosas colhidas em matadouros com SIF e SIM nas Regionais de Açailândia e Imperatriz. .....	33
Figura 06: Acondicionamento das amostras de soro bovino colhidas em matadouros com SIF e SIM nas Regionais de Açailândia e Imperatriz.....	34
Figura 07: Realização de teste de AAT segundo o protocolo estabelecido por Alton et al. (1988) e preconizado pelo PNCEBT.....	35
Figura 08: Leitura do teste de AAT e observação de amostras positivas e negativas na placa ..	36
Figura 09: Amostra positiva no teste do AAT .....	36
Figura 10: Amostra negativa no teste do AAT .....	36
Figura 11: Realização do teste de 2-ME preconizado pelo PNCEBT.....	37
Figura 12: Leitura de teste de 2-ME .....	37
Figura 13: Mapa dos municípios positivos no teste AAT .....	41
Figura 14: Mapa dos municípios positivos no teste 2 ME .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2-ME** – Teste do 2- Mercaptoetanol

**AAT** – Antígeno Acidificado Tamponado

**FC** – Fixação de Complemento

**FPA** – Teste de Polarização Fluorescente

**AGED/MA** – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

**EAC** – Escritório de Atendimento a Comunidade

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IgG** – Imunoglobulina da Classe G

**IgM** – Imunoglobulina da Classe M

**MAPA** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

**PNCEBT** – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

**RIISPOA** – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

**UR** – Unidade Regional

**ULSAV** – Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal

**SIF** – Serviço de Inspeção Federal

**SIM** – Serviço de Inspeção Municipal

## RESUMO

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Apresenta-se na forma endêmica em muitos países, resultando em prejuízos econômicos significativos, aos sistemas de produção e notáveis implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico. Animais infectados atuam como fonte de infecção para os humanos pela ingestão de leite e derivados contaminados, manipulação de carnes, fetos e membranas fetais, sangue e outros tecidos por exposição ocupacional de fazendeiros, magarefes, médicos veterinários e colaboradores que entram em contato com o micro-organismo. Há uma preocupação no entendimento da relação entre bursite e detecção direta ou indireta de *Brucella* spp. em bovinos. Neste trabalho objetivou-se realizar o estudo epidemiológico da brucelose bovina em matadouro sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Serviço de Inspeção Municipal (SIM) no Estado do Maranhão, com abate, procedentes de diferentes municípios maranhenses e de outras regiões do país, por um período de um ano através da coleta de sangue durante o abate para realização de análises pelos testes do AAT e 2-ME. Foi realizado a aplicação de um questionário com os proprietários para realizar o estudo dos possíveis fatores de risco associados à brucelose. Foram coletadas 1265 amostras de soro bovino, onde se verificou 39 amostras reagentes no teste AAT e 15 reagentes no 2-ME, sendo dentre estas apenas 01 macho reagente. Das 15 bursites coletadas, apenas 01 foi reagente no teste 2-ME, obtendo uma prevalência de brucelose bovina em matadouro no estado do Maranhão de 1,19%. Conclui-se que a infecção por *Brucella abortus* em animais abatidos em matadouros sob Serviços de Inspeção Federal e Municipal nos municípios de Imperatriz e Açailândia do estado do Maranhão está presente, e ocorre com maior frequência em fêmeas. Os principais fatores de risco para a doença são a ocorrência de abortamentos nas propriedades, a venda de animais sem exames e a não realização de exames que testem os animais antes da inclusão nos rebanhos e antes do abate.

**Palavras chaves:** *Brucella abortus*, bovinos, doença ocupacional, zoonoses, frigorífico.

## ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*. It is endemic in many countries, resulting in significant economic damage to production systems and notable implications for animal and public health, given its zoonotic nature. Infected animals act as a source of infection for humans through the ingestion of contaminated milk and derived products, handling of fetal meat, fetuses and membranes, blood and other tissues by occupational exposure of farmers, magarefes, veterinarians and employees who come in contact with the micro-body. There is concern in the understanding of the relationship between bursitis and direct or indirect detection of *Brucella* spp. in cattle. The objective of this study was to carry out the epidemiological study of bovine brucellosis in a slaughterhouse under Federal Inspection Service (SIF) and Municipal Inspection Service (SIM) in the State of Maranhão, with slaughter, from different municipalities of Maranhão and other regions of the country, For a period of one year through collection of blood during slaughter for analysis by the AAT and 2-ME tests. A questionnaire was applied with the owners to study the possible risk factors associated with brucellosis. 1265 bovine serum samples were collected, where 39 reagent samples were tested in the AAT test and 15 reagents in the 2-ME, of which only 1 reagent male. Of the 15 bursitis collected, only 01 was reactive in the 2-ME test, obtaining a prevalence of bovine brucellosis in a slaughterhouse in the state of Maranhão of 1.19%. It is concluded that *Brucella abortus* infection in animals slaughtered in slaughterhouses under Federal and Municipal Inspection Services in the municipalities of Imperatriz and Açailândia in the state of Maranhão is present, and occurs more frequently in females. The main risk factors for the disease are the occurrence of miscarriages on the farm, the sale of animals without tests and the failure to perform tests that test the animals before inclusion in the herds and before slaughter.

Key words: *Brucella abortus*, cattle, occupational disease, zoonoses, refrigerator

## 1. INTRODUÇÃO:

O Brasil, em 2015 possuía aproximadamente 215 milhões de bovinos, e o Maranhão detinha 7.660.292 animais, sendo um dos esteios para a economia brasileira com altos índices de produção, e comercialização da carne e seus derivados (SOLA, 2014; AGED, 2016; IBGE, 2016).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2016), o Brasil é um dos países que atende as expectativas de demanda e sanidade, ocupando posições estratégicas entre os grandes fornecedores mundiais, tendo nos anos de 2013, 2014, 2015 e 2016 abatido aproximadamente 24,4 milhões, 27 milhões, 25 milhões e 23 milhões de bovinos respectivamente, promovendo exportações de carne bovina *in natura* e industrializada, que somaram nesses mesmos anos um total de 1,2 milhões, 1,3 milhões, 1,1 milhões e até julho de 2016, 655.378 de toneladas distribuídas por 200 países dos cinco continentes.

Deste montante, o Maranhão abateu nos anos de 2013, 2014, e 2015 um total de 350.650 bovinos, 445.606 e 480.781 respectivamente, em estabelecimentos de abate de bovinos sob Serviço de Inspeção Federal - SIF (BRASIL, 2015) e em matadouro sob Serviço de Inspeção Municipal - SIM um montante de 292.897 no período de 2013 a 2015 (AGED, 2016).

Para o Brasil manter este comércio há a necessidade de melhoria da sanidade e produtividade na qualidade dos produtos, promovendo a rastreabilidade e os programas de prevenção, controle e erradicação de doenças por meio de vacinações, que são requisitos primordiais para manter-se como um grande exportador e competidor internacional (UFLA, 2012).

Dentre as doenças de importância econômica e de saúde pública, destaca-se a brucelose que é uma enfermidade infectocontagiosa e tem com agente etiológico bactérias do gênero *Brucella sp.*, cosmopolita, endêmica em vários países, causadora de prejuízos econômicos (como perda da credibilidade na exportação da carne bovina), e por fim, uma zoonose com impacto à saúde pública (BRASIL, 2006; SOLA, 2014).

A infecção de bovinos por *Brucella abortus* determina problemas econômicos na produção por acometer, principalmente, os sistemas reprodutores,

osteointerarticular e causarem abortos no terço final da gestação, nascimento de animais fracos, queda na produção de leite, orquite, epididimite e infertilidade segundo Paulin e Ferreira Neto (2003), e nos seres humanos apresenta-se de forma sistêmica de acordo com Minervino (2011).

A brucelose é transmitida ao homem por meio da ingestão de alimentos como carne, leite e seus derivados contaminados, contato com sangue, restos fetais, carcaças de animais, fetos e fluidos de animais infectados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Nos animais a transmissão ocorre pelo contato com restos de partos (fetos mortos ou restos de placentas) e pela inseminação artificial (LAGE, 2008).

No Brasil, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou no ano de 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), com objetivo de diminuir o impacto negativo destas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional. Preconizou-se a vacinação das fêmeas de três a oito meses de idade, e o diagnóstico sorológico dos animais por meio das provas do antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol (constituído pelas provas de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol (SAL/2-ME) e o teste do anel em leite (TAL), para o monitoramento de estabelecimentos certificados como livres de brucelose. (BRASIL, 2006).

De acordo com Santos (2007), Viana (2010) e Silva et al. (2011), a brucelose pode ser classificada como uma enfermidade ocupacional, por estarem em risco diário de infecção, os trabalhadores pecuários, açougueiros, magarefes e médicos veterinários.

Na tecnologia de abate, as metodologias para averiguar a saúde do animal a ser abatido consistem de inspeção "*ante-mortem*" e "*post-mortem*". Esta última, porém, apresenta certo agravante, que é a exposição dos funcionários e médicos veterinários que estão em contato direto com carne, sangue, vísceras, fezes, urina, secreções vaginais ou uterinas, restos placentários, líquidos amnióticos e fetos abortados de animais, que possivelmente podem estar infectados (DIAS, 2012).

Na rotina de inspeção sanitária da carne, os médicos veterinários não possuem meios de diagnósticos específicos que permitem associarem as alterações observadas no *post-mortem* com a infecção brucélica (FREITAS; OLIVEIRA, 2005)

De acordo com relatos de Viana et al. (2010), apenas a verificação de sinais ou de lesões, pouco frequentes e difíceis de detectar nos exames “*ante e post-mortem*”, o diagnóstico da brucelose bovina em matadouro não se apresenta de forma segura. Portanto, Sola (2014), relata que o desafio é a busca de alternativas que proporcionem segurança e rapidez no diagnóstico das diversas lesões identificadas no decorrer das atividades de inspeção nos estabelecimentos de abate.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Na rotina de inspeção sanitária da carne, os médicos veterinários não possuem meios de diagnósticos específicos para a confirmação da infecção brucélica. Este desafio conduz a busca de alternativas que proporcionem segurança e rapidez no diagnóstico das diversas lesões identificadas no decorrer das atividades de inspeção nos estabelecimentos de abate.

Desta forma, considerando a importância de estudos que mostrem o impacto da brucelose nas criações, com redução de índices produtivos e reprodutivos e ainda, como zoonose com forte associação a determinadas classes de profissionais. Considerando também a importância da realização de trabalhos em frigoríficos como fonte de obtenção de dados epidemiológicos primários é que se realizou a presente pesquisa.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

- Realizar estudo epidemiológico da brucelose bovina em matadouro sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) e Serviço de Inspeção Municipal (SIM) no Estado do Maranhão.

### 3.2 Específicos

- Investigar a prevalência da brucelose bovina (*Brucella abortus*) em soros sanguíneos de animais abatidos em matadouros sob SIF e SIM nas regionais de Açailândia e Imperatriz, Estado do Maranhão.
- Relacionar resultados de amostras séricas reagentes com a sorologia de animais que apresentaram bolsas serosas/bursite no exame *post mortem*.
- Identificar fatores de risco para brucelose em bovinos abatidos em matadouros sob SIF e SIM nas regionais de Açailândia e Imperatriz, Estado do Maranhão.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA:

### 4.1 Conceito e Histórico:

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella* e a espécie *abortus*, uma bactéria Gram Negativa, que acomete principalmente os bovinos (BRASIL, 2006; SOLA,2014;)

A brucelose foi descrita no homem, pela primeira vez, por Marston em 1859, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta. Bernhard Bang, um Patologista Veterinário dinamarquês, isolou em 1895, um micro-organismo do útero e membranas fetais resultantes do aborto de vacas, identificando-o como *Bacillus abortus* sendo conhecida como moléstia de Bang, mal de Bang, febre de malta ou aborto infeccioso (NICOLETTI, 2002; POESTER *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em 1913, Gonçalves Carneiro relatou o primeiro caso de brucelose humana no Brasil e, no ano seguinte, Danton Seixas realizou pela primeira vez no país, o diagnóstico clínico da brucelose bovina, no estado do Rio Grande do Sul (PAULIN & FERREIRA NETO 2003).

### 4.2 Características da *Brucella*:

As bactérias do gênero *Brucella* pertencem à classe *Proteobacteria*, são bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas, imóveis e não esporuladas.

Dentro deste gênero são descritas dez espécies independentes, classificadas principalmente por diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas (LAGE, 2008; SOLA, 2014;)

As espécies de *Brucella* e seus biovares são diferenciados por meio de testes como a sorotipagem, tipificação de fagos, requerimentos de CO<sub>2</sub>, sensibilidade a corantes, produção de H<sub>2</sub>S e das propriedades metabólicas (OIE, 2009).

São descritas dez espécies diferentes de *Brucella*, classificadas pela sua patogenicidade, características antigênicas e preferência por hospedeiros. Sendo elas, com seus respectivos hospedeiros preferenciais: *B. abortus* (bovinos e bubalinos); *B. melitensis* (isoladas em cabras, ovelhas e camelos); *B. suis* (suínos); *B. canis* (caninos); *B. ovis* (ovinos) e *B. neotomae* (rato do deserto, *Neotomae lepida*). As outras espécies como *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas em mamíferos marinhos (focas, leões marinhos, golfinhos e baleias) e *B. microti* (procedente de ratas selvagens) e a *B. inopinata* não foram diferenciadas em biovares (SCHNEIDER et al 2013; SOLA, 2014;).

#### **4.3 Epidemiologia:**

A enfermidade possui grande importância na saúde pública devido à possibilidade de transmissão para seres humanos (OIE, 2009). A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses (SANTOS, 2007; LAGE, 2008;). Mota (2011), relata que a situação epidemiológica, de diversas regiões e países atingidos, é variáveis de acordo com o desenvolvimento sócio econômico da área e pelos fatores associados à transmissão entre rebanhos como, por exemplo, o tamanho do rebanho, a densidade populacional, o tipo e raça dos animais.

A *B. abortus* é a mais prevalente infecção em bovinos por *Brucella sp* no Brasil, seguida por *B. suis* em suínos. A *B. melitensis* que acomete caprinos e *B. neotomae* que afeta o roedor do deserto nunca foram isoladas no país (BRASIL, 2006).

#### **4.4 Situação no Brasil e no Maranhão:**

A brucelose no Brasil é uma doença endêmica, com prevalências mais elevadas em regiões com maior densidade de bovinos e prevalência da infecção por *B. abortus* (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003)

Como parte do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), foi instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), inquéritos sorológicos com o objetivo de determinar a situação epidemiológica da brucelose bovina nas Unidades Federativas e direcionar a escolha das estratégias de controle adequadas, que podem diferir de acordo com a frequência e a distribuição da doença. (ALVES et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009; CHATE et al., 2009; DIAS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009; KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009; MARVULO et al., 2009; NEGREIROS et al., 2009; OGATA et al., 2009; ROCHA et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009; SILVA et al., 2009; VILLAR et al., 2009).

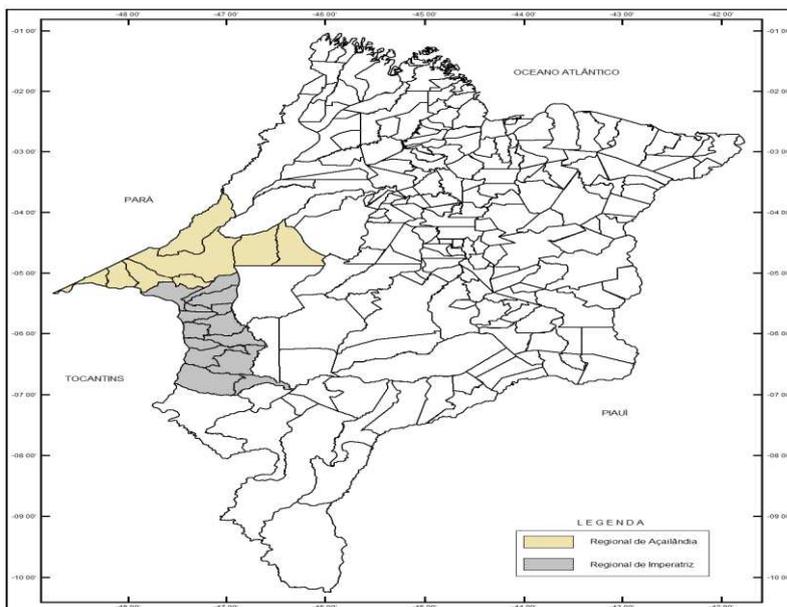
Ferreira Neto (2003), mostrou que o estudo sorológico realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975 constatou prevalência de 4,0% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,0% na região Nordeste e 4,1% na região Norte (POESTER et al., 2002). Lage (2008), observou que estudos epidemiológicos realizados por Paulin e Ferreira Neto, no período de 2001 a 2004 identificaram semelhança nos dados obtidos, apresentando crescimento da prevalência no sentido Centro-Oeste/Norte do país e a diminuição significativa da prevalência da doença nos estados de Minas Gerais e Santa Catarina.

No Maranhão, a prevalência de propriedades positivas foi estimada em 11,42% e a de animais soropositivos foi de 2,52% segundo estudo realizado por Borba, (2012).

#### **4.5 Área Trabalhada:**

De acordo com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED, 2016), o estado faz parte do Circuito Pecuário Nordeste, está classificado como Zona Livre de Febre Aftosa com vacinação, conforme figura 01. Possui o segundo rebanho bovino do Nordeste, com 7.576.806 bovinos, superado pelo Estado da Bahia. Têm o maior rebanho bufalino com 83.490 indivíduos, totalizando um

rebanho bovino de 7.660.292 animais em Maio de 2016, sendo detentor do 12º rebanho do país. Na região pré-amazônica, localizada no sudoeste do estado, destacam –se os municípios de Imperatriz e Açailândia como detentores dos maiores rebanhos do estado conforme figura 02 e únicos municípios que possuem matadouros com Serviço de Inspeção Federal e Municipal, por este motivo foram escolhidos como área a ser trabalhada.



**Figura 01:** Mapa do Maranhão – Fonte: AGED/IBGE



O período de tempo da infecção á resposta dos anticorpos varia em média de duas semanas até seis meses, tendo como fatores que influenciam principalmente a suscetibilidade do animal, via de infecção, período de prenhez. Sendo quanto mais adiantada a prenhez, mais curto é o período de incubação da doença.

Com o desenvolvimento da imunidade celular após o primeiro aborto, ocorre uma diminuição no tamanho das lesões nos placentomas, reduzindo a frequência de abortos e possibilitando os natimortos ou nascimento de bezerros fracos e retenção de placenta.

#### **4.7 Sinais Clínicos e Lesões:**

Os principais sinais clínicos observados nos animais são os ligados a problemas reprodutivos, sendo mais frequente, aborto no terço final da gestação, natimortos e nascimento de bezerros fracos. Frequentemente, ocorre a retenção placentária e infertilidade temporária ou permanente nas fêmeas, e nos machos a infecção pode causar orquite com conseqüente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (LAGE, 2008).

No aparelho locomotor, os micro-organismos do gênero *Brucella*, principalmente a *B. abortus* localiza-se na bursa, tendões, músculos e articulações, causando artrites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas; espondilites e bursites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares, podendo atingir a medula óssea e bainha dos tendões, sendo o achado clínico clássico, o abscesso fistulado ou não na região da cernelha, lesão conhecida como “mal da cernelha” ou “mal das cruces”, que acomete principalmente os equídeos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

De acordo com Langenegger et al. (1975); Freitas e Oliveira (2005); Viana et al. (2010), associam-se a presença de bursite à infecção brucélica, visto a frequência de isolamento e detecção do agente em muitos casos, além da detecção de títulos de anticorpos aglutinantes compatíveis com a doença.

#### **4.8 Transmissibilidade e Resistência da Brucella:**

A ocorrência da brucelose nos bovinos depende de fatores como idade, estado reprodutivo do animal, resistência natural, ou status imunológico, via de

infecção, dose infectante e virulência da cepa infectante (COSTA, 2010). Nos bovinos, a infecção apresenta evolução crônica e acomete animais de todas as idades, porém os animais mais jovens são mais resistentes à infecção por *B. abortus*, sendo esta maior nos animais antes da puberdade, conseguindo debelar a doença, e mais frequente em indivíduos sexualmente maduros caracterizando-a como uma enfermidade de animais aptos a se reproduzir (CAVALCANTE, 2011; LLANO, 2013).

A principal porta de entrada da brucelose em bovinos é a oral, sendo muito importante a via aerógena, podendo ocorrer na reprodução, raramente por monta natural, mas principalmente por inseminação artificial. (LAGE, 2008). As infecções brucélicas nos bovinos estão associadas, principalmente, a problemas reprodutivos como abortamentos, nascimento de crias fracas e baixa fertilidade, com efeitos desastrosos para a pecuária. (POESTER et al., 2009).

A entrada do agente nas criações ocorre, principalmente, através de fêmeas infectadas, que descarregam patógenos no ambiente através de fetos abortados, período puerperal e restos de placentas, contaminando o pasto, água e pastagens que pelos hábitos dos bovinos de lamber e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas, favorece a transmissão da brucelose. (BRASIL, 2006; SOLA, 2014).

As bactérias do gênero *Brucella* são muito resistentes aos fatores ambientais. *B. abortus* pode permanecer por longos períodos (seis meses ou mais) em material de aborto ou parto nas pastagens. A permanência destas bactérias no ambiente aumenta em determinadas condições como a presença de sombra, umidade e baixas temperaturas (BRASIL, 2006). Todas as espécies do gênero são sensíveis ao calor e à acidez, e quando submetidas à ação de desinfetantes comuns, como soluções de formaldeídos a 2%, produtos clorados (2,5% de cloro ativo), compostos fenólicos a 2,5% e permanganato de potássio (1:5000), a eliminação de *Brucella* spp ocorre em, no máximo, 15 minutos. O álcool a 70% destrói imediatamente as bactérias enquanto o carbonato de cálcio (1:10) as elimina em 30 minutos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; OIE, 2009).

Animais infectados atuam como fonte de infecção para os humanos pela ingestão de leite e derivados contaminados, manipulação de carnes, fetos e membranas fetais, sangue e outros tecidos contendo o agente, por exposição

ocupacional, de fazendeiros, magarefes, médicos veterinários e pessoas que trabalham com laticínios ou estabelecimentos de abate que possam entrar em contato com o micro-organismo (VIANA, et al., 2010)

Esta doença possui caráter profissional, devido Médicos Veterinários, vaqueiros, peões, magarefes, agentes de inspeção e laboratoristas estarem sujeitos à infecção, ou acidentalmente por manuseio e aplicação da vacina viva da *B. abortus* cepa B19 (ALMEIDA et al., 2000).

Em carnes, a *Brucella* spp pode manter-se viável durante meses, sendo pouco afetada pela acidificação muscular, refrigeração ou congelamento. Além do calor, a eliminação do agente só ocorre em situações de pH inferior a 4 (PESSEGUEIRO et al., 2003). Mafra (2008) relatou que, as *Brucella* spp, sobrevivem em carnes conservadas em câmaras frigoríficas, representando risco de infecção em manipuladores ou consumidores de carne, e Sola (2011) confirmou este relato quando verificou que a *Brucella* spp pode permanecer viável em carnes refrigeradas ou congeladas, sendo pouco danificada pela acidez muscular e que para a inativação da bactéria, deve haver a presença de calor e situações em que o pH seja inferior a 4.

Os casos de brucelose por ingestão de carne ou derivados são raros, visto o número reduzido de bactérias no músculo e o raro consumo de carne crua. Já o consumo de sangue e medula óssea pode ser considerado veículo de transmissão da doença. A sobrevivência da *Brucella* spp em carnes depende do grau de contaminação no início do processo e do tipo de tratamento tecnológico empregado. Essas bactérias podem persistir nas células do sistema monocítico fagocitário, nas secreções uterinas, na glândula mamária e na medula óssea. Por isso, o descarte dos tecidos que concentram um grande número de bactérias pode diminuir ou até mesmo evitar a contaminação de carcaças e vísceras durante o abate (PESSEGUEIRO et al., 2003).

A sobrevivência de *Brucella* spp no leite e produtos lácteos depende da temperatura, pH e da presença de outros micro-organismos que possam inibir a multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a viabilidade é mantida mesmo em temperatura de congelamento. No entanto, a fervura, processos de pasteurização e os métodos de

esterilização são eficazes na eliminação do micro-organismo (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

#### **4.9 Diagnóstico:**

O diagnóstico de uma enfermidade é fundamental para se estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização do agente. Nesse contexto, a brucelose animal pode ser diagnosticada por meio de diferentes métodos, de forma isolada ou em conjunto (LAGE, 2008). O diagnóstico clínico baseia-se na presença de sinais como aborto, nascimento de bezerros fracos, retenção de placenta e esterilidade de machos e fêmeas. O diagnóstico epidemiológico analisa o histórico dos rebanhos nas propriedades e o laboratorial, fundamenta-se no isolamento e identificação do agente etiológico, na detecção do DNA dos micro-organismos, e na presença de anticorpos nos fluidos orgânicos (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008). Estas formas de diagnóstico devem ser trabalhadas em conjunto para que seja possível identificar o agente causador de uma enfermidade.

#### **4.10 Métodos Diretos**

Os métodos diretos de diagnóstico para brucelose incluem o isolamento e a identificação do agente, a imunohistoquímica e os métodos de detecção de ácidos nucleicos, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). (BRASIL, 2006; SOLA, 2011; SOLA, 2014;)

#### **4.11 Métodos Indiretos**

Os métodos indiretos ou sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose constituem-se em um importante recurso utilizado nas campanhas de controle e erradicação da doença em bovinos e bubalinos (OLIVEIRA, 2003).

Os testes sorológicos baseiam-se na reação entre antígenos de *Brucella* spp e anticorpos produzidos em resposta a uma infecção (LAGE, 2008) e detectam os anticorpos contra *Brucella* spp presentes em diversos fluidos corporais como soro sanguíneo, muco vaginal, sêmen e leite. (BRASIL, 2006)

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da enfermidade, destacam-se o de Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAT), Soroaglutinação Rápida em

Placa (SAR), 2- Mercaptoetanol (2-ME), Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Fixação de Complemento (FC), Teste de Polarização Fluorescente (FPA), Rivanol e o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (MEGID, et al, 2000; OLIVEIRA, 2003).

O PNCEBT definiu como testes oficiais o AAT e o TAL como testes de rotina e o 2- ME, FPA, e o FC como confirmatórios para detecção do agente da brucelose. (BRASIL, 2006 e BRASIL, 2016)

Outros testes de diagnóstico que existem no mercado são: teste de imunoabsorção enzimática indireto (i- ELISA), teste de ELISA competitivo (c – ELISA). (BRASIL, 2006; OLIVEIRA, 2013)

#### **4.12 Fatores de Risco:**

Um dos principais fatores de risco para a introdução da brucelose em um rebanho livre é a aquisição de animais sem diagnóstico para as principais doenças. Outros fatores, como a ausência ou baixa taxa de vacinação, o grande tamanho e alta densidade de alguns rebanhos e a demora na eliminação dos animais infectados, propiciam a maior transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

#### **4.13 PNCEBT e Controle:**

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) instituído no Brasil em 2001 pelo MAPA teve como principal objetivo diminuir o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, promovendo a competitividade da pecuária nacional, relatando que o combate à brucelose foca na vacinação de bezerras entre os três e os oito meses de idade e no controle do trânsito animal, sendo de livre adesão o saneamento dos rebanhos (BRASIL, 2006). Em 2016, houve uma atualização do PNCEBT onde, tem como objetivo baixar a prevalência e a incidência visando a erradicação da Brucelose e Tuberculose.

O PNCEBT determina que é obrigatória a vacinação de fêmeas das espécies bovinas e bubalinas que possuem de 3 a 8 meses utilizando a vacina viva liofilizada elaborada com amostra 19 de *B. abortus* (B 19), após esta idade, o produtor deverá utilizar a vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes RB51,

posteriormente devem ser marcadas com ferro candente o que identifica os animais que foram e quando foram vacinados (BRASIL, 2016).

A eficácia de um programa depende, em parte, da padronização e qualidade dos procedimentos de diagnósticos utilizados. De acordo com o PNCEBT Animal, os testes oficiais de diagnóstico indireto para brucelose bovina são: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – AAT, Teste do Anel em Leite – TAL, Teste do 2-Mercaptoetanol – 2-ME e Soroaglutinação Lenta (SAL), Teste de Polarização Fluorescente (FPA), Teste de Fixação do Complemento – FC. (BRASIL, 2006).

O controle da brucelose depende fundamentalmente da identificação e separação dos animais positivos e suspeitos daqueles não infectados e posterior sacrifício dos animais positivos (MOLNÁR et al., 2000; MOLNÁR et al., 2003). O controle tem como objetivo diminuir o número de focos da doença, controlar o trânsito de animais e a certificação das propriedades livres. A vacinação propõe reduzir a prevalência da doença.

#### **4.14 Brucelose como Zoonose**

Do ponto de vista da saúde pública, a brucelose deve ser considerada não só como causa de enfermidade, de incapacidade para o trabalho e de diminuição do rendimento, mas também como fator nocivo para a produção de alimentos (FREITAS e OLIVEIRA, 2005).

Além dos problemas causados à saúde pública, o caráter zoonótico da doença também acarreta perdas, na maioria das vezes relacionadas ao custo do tratamento humano e ao período de ausência no trabalho durante a convalescença (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Nociti, 2008 afirma que apesar da transmissão para o homem ocorrer principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, a Brucelose é considerada uma doença de caráter ocupacional. Dutra, 2015 cita que a doença acomete principalmente os grupos profissionais da área da pecuária como médicos veterinários, vaqueiros, pecuaristas e funcionários que trabalham diretamente na ordenha ou abate de animais. Freitas e Oliveira, 2005 relata sobre o risco de contágio por Brucelose em pessoas que trabalham com o abate ou manipulam sangue, carcaças e vísceras.

#### **4.15 Perdas Econômicas:**

A ocorrência de brucelose bovina em um país ou região pode resultar em perdas econômicas significativas como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal. (FREITAS e OLIVEIRA, 2005; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003). Provoca perdas no rendimento industrial com a condenação do leite e da carne oriundos de animais infectados, gastos significativos devidos aos altos custos para a implementação dos programas de controle e erradicação da doença, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezerros fracos, baixa fertilidade nas fêmeas e principalmente o declínio na produção de leite e carne nas propriedades rurais (POESTER et al., 2009). Além do prejuízo com as condenações das carcaças nos matadouros.

A O.I.E. (World Organization for Animal Health), classifica a brucelose como doença da lista B, onde são incluídas as enfermidades que têm importância sócio-econômica e/ou para a saúde pública e consequências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Estima-se que a brucelose bovina determina entre outros, redução láctea de 20 a 25%, queda na produção cárnea de 10 a 15%, ocorrência de aborto em 15% dos casos, sendo que uma a cada cinco vacas que abortam tornam-se inférteis, acarretando problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultuosos na população bovina, contribuindo para uma considerável baixa na produção de alimentos (NOCITI, 2008).

#### **4.16 Inspeção *Ante e Post-mortem*:**

Na inspeção *ante e post-mortem*, os profissionais habilitados para tal função não possuem de recursos para o diagnóstico específico e confirmatório de diferentes lesões observadas nesta etapa do abate que os permitem associarem as alterações observadas durante a inspeção sanitária com a infecção brucélica. Este desafio conduz a busca de alternativas que possam proporcionar segurança e rapidez no diagnóstico das diversas lesões identificadas no decorrer das atividades de inspeção nos estabelecimentos de abate. (FREITAS & OLIVEIRA, 2005)

Na linha de abate, as metodologias mais rápidas e baratas para averiguar a saúde do animal a ser abatido consistem de inspeção “*ante-mortem*” e “*post-mortem*”, e esta última com um agravante, que é a exposição dos colaboradores da inspeção, por manipularem: carne, sangue, vísceras, fezes, urina, secreções vaginais ou uterinas, restos placentários, líquidos amnióticos e fetos abortados de animais, que possivelmente podem estar contaminados com micro-organismos zoonóticos (DIAS, 2012).

Baseado na verificação de sinais ou de lesões, pouco frequentes e difíceis de detectar nos exames “*ante e post-mortem*”, o diagnóstico da brucelose bovina em matadouro é pouco seguro. (VIANA et al.2010)

As bursites da cernelha de bovinos são de difícil visualização à inspeção *ante-mortem*, sendo de pouco valor a tentativa de separar os animais suspeitos (LANGENEGGER et al., 1975).

Segundo Freitas e Oliveira (2005), em lesões inflamatórias de origem hematogênica denominadas bursites, caracterizadas como bolsas serosas na região da cruz, adjacentes à porção funicular do ligamento cervical e apófises espinhosas cervicais, têm sido isoladas brucelas e detectados títulos de anticorpos aglutinantes compatíveis com brucelose.

Viana et al. (2010), tenta estabelecer relação entre bursite e detecção direta ou indireta de *Brucella sp.* em bovinos com essa lesão. A frequência da *Brucella sp.* em bovinos com bursite apresenta ampla variação, embora seja sempre baixa a prevalência da lesão nos contingentes de abate estudados.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

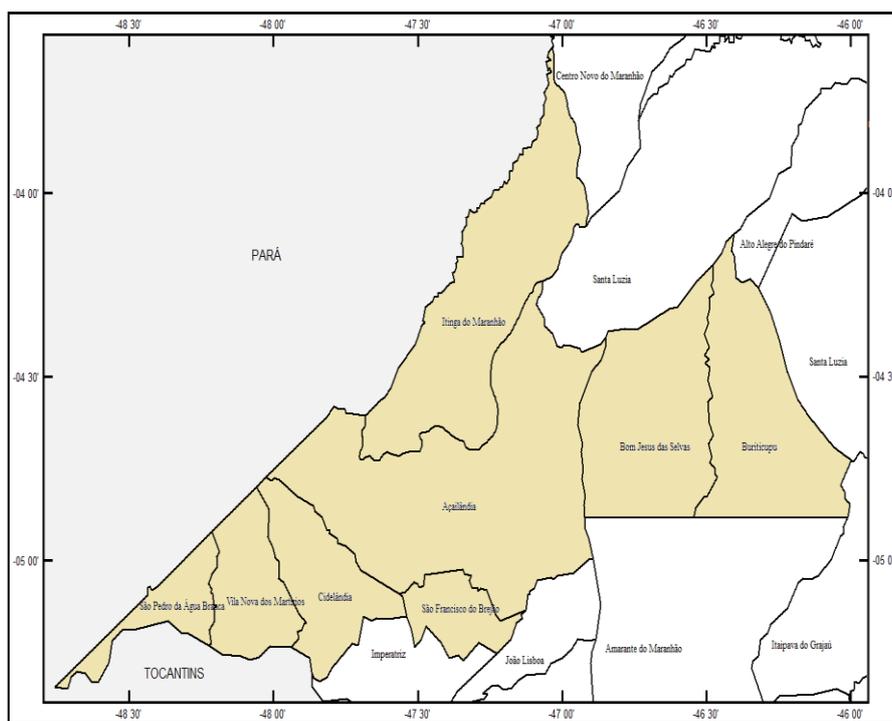
O presente trabalho compreendeu um estudo transversal observacional realizado em etapas, são elas: seleção da área de estudo, seleção da população, amostragem, coleta de amostras biológicas (sangue e bursites), realização de testes diagnósticos e estudo dos fatores de risco.

### **5.1 Área de Estudo**

Este estudo foi realizado em 02 (dois) matadouros com Serviço de Inspeção Municipal (SIM), e 02 (dois) com Serviço de Inspeção Federal (SIF) da

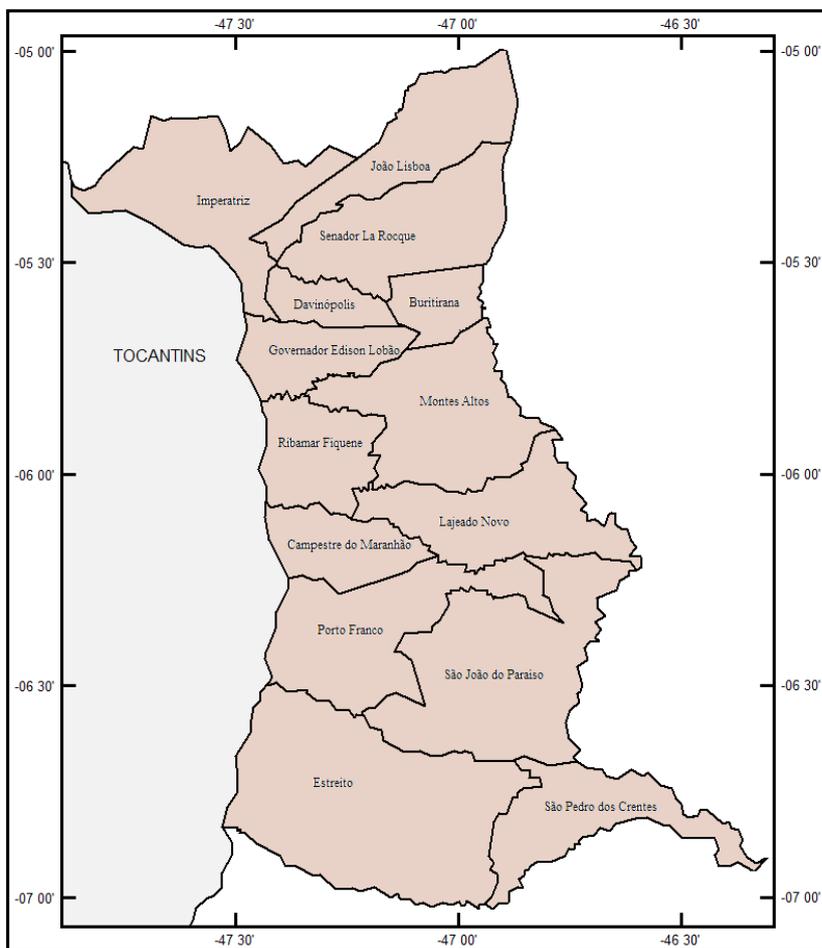
Regional de Imperatriz e Açailândia-Maranhão com abate aproximado entre 150 e 400 bovinos/dia respectivamente, oriundos de diferentes municípios e de outras regiões do país como os estados do Pará e Tocantins, nos meses de outubro de 2015 a setembro de 2016, totalizando 12 meses de estudo.

A Regional de Açailândia-MA (Figura 03) é composta por oito municípios, são eles: Açailândia, Bom Jesus das Selvas, Buriticupu, Itinga, São Francisco do Brejão, Cidelândia, Vila Nova dos Martírios e São Pedro da Água Branca. Na regional existem dois matadouros oficiais, sendo um com SIF e um com SIM, além de quatro matadouros clandestinos (São Francisco do Brejão, Cidelândia, Vila Nova dos Martírios e Buriticupu).



**Figura 03:** Mapa dos municípios da regional de Açailândia – Fonte: AGED/IBGE

A Regional de Imperatriz-MA (Figura 04) é constituída por 15 municípios: Imperatriz, João Lisboa, Senador La Roque, Buritirana, Amarante, Davinópolis, Governador Edson Lobão, Ribamar Fiquene, Montes Altos, Campestre, Lageado Novo, Porto Franco, São João do Paraíso, Estreito, São Pedro dos Crentes. Nessa regional estão alocados três matadouros oficiais, sendo um com SIF e dois com SIM, além de quatro matadouros clandestinos (Montes Altos, Estreito, Amarante e Porto Franco).



**Figura 04:** Mapa dos municípios da regional de Imperatriz – Fonte: AGED/IBGE

## 5.2 População Estudada

Constituiu-se de bovinos, machos e fêmeas, com idade igual ou superior a 24 meses encaminhados ao abate.

## 5.3 Amostragem

Para determinar o número de bovinos a serem amostrados, utilizou-se a fórmula de Triola (1999) e Callegari e Jacques (2007).

$$n_0 = \frac{1}{E_0^2} \qquad n = \frac{N \cdot n_0}{N + n_0}$$

Onde:

$N$  = tamanho da população;

$E_0$  = erro amostral tolerável;

$n_0$  = primeira aproximação do tamanho da amostra

$n$  = tamanho da amostra.

Erro Amostral = 6%

Grau de Confiança = 94%

Considerando um total de quatro estabelecimentos com abate diário de 400 e 200 bovinos para os matadouros com SIF e de 150 a 100 para os matadouros com SIM, erro amostral de 6% e grau de confiança de 94% obteve-se uma amostra de 1.104, distribuídos proporcionalmente em relação à quantidade de animais abatidos por cada estabelecimento no período estudado.

Durante a coleta, houve períodos em que o abate em alguns estabelecimentos foi paralisado e conseqüentemente não pode haver a coleta no período estabelecido. Para que não fosse comprometida a pesquisa, coletou-se amostras nos demais estabelecimentos em outros dias totalizando 1265 amostras e 15 bolsas serosas (bursites).

## 5.4 Coleta de Dados

### 5.4.1 Amostras de animais

Dados referentes ao sexo e idade cronológica dos animais, assim como a procedência dos animais foram levantados nos registros oficiais do estabelecimento de abate por meio da Guia de Trânsito Animal (GTA).

No momento da sangria dos bovinos, foi colhida uma alíquota de 10 mL de sangue em tubos de ensaio estéreis, sem anticoagulante. Em seguida, os tubos foram colocados em posição inclinada de 45°, mantidos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até que ocorresse a coagulação sanguínea. Sendo posteriormente acondicionados em caixas isotérmicas, contendo gelo e transportados ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), para centrifugação a 1500 x G, durante 10 minutos, para a separação do soro.

Após a centrifugação, foi colocada a alíquota dos soros em tubos plásticos de polipropileno com capacidade de 2,0 mL (ependorfs) e mantida congelada a -20°C até o momento da realização dos exames laboratoriais (Figuras 05 e 06).



**Figura 05:** Acondicionamento das amostras de soro bovino e de bolsas serosas colhidas em matadouros com SIF e SIM nas Regionais de Açailândia e Imperatriz. –  
Fonte: Anna Karoline



**Figura 06:** Acondicionamento das amostras de soro bovino colhidas em matadouros com SIF e SIM nas Regionais de Açailândia e Imperatriz. – Fonte: Anna Karoline

Durante a inspeção rotineira na sala de abate realizada pelos funcionários dos serviços de inspeção, feita pela incisão dorso – ventral a partir da terceira vertebra torácica, entre os ligamentos cervicais, e os animais que apresentaram qualquer alteração morfológica na membrana mucosa da cernelha tiveram o exsudato e a parte fibrosada das bolsas serosas (bursistes) colhidas.

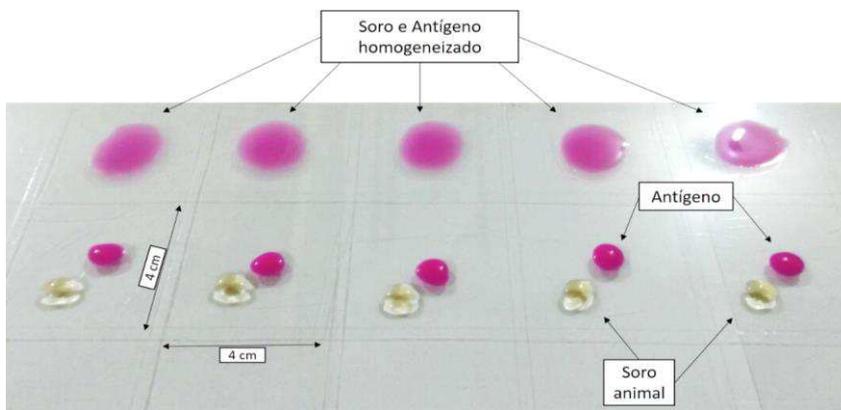
As bursites foram retiradas, intactas ou como se apresentavam após a separação das hemi-carcaças, de suas localizações topográficas e inserções anatômicas, através do seccionamento de tecidos vizinhos, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas sob resfriamento para o laboratório; e preparadas para a coleta asséptica de exsudato contido no interior das bolsas e mantidos a  $-20^{\circ}$  C em tubos plásticos estéreis.

### **5.5 Testes Diagnósticos**

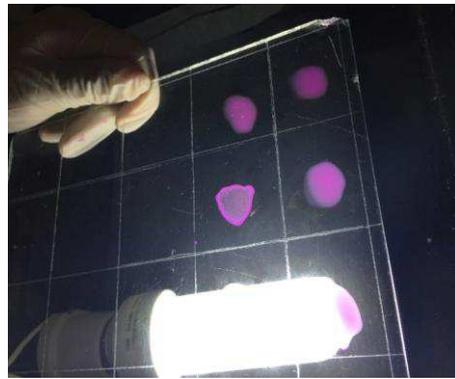
As amostras de sangue coletadas foram submetidas a métodos indiretos de diagnósticos, baseado na detecção de anticorpos.

### 5.5.1 Antígeno acidificado tamponado (AAT)

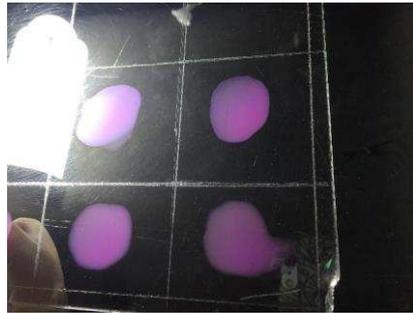
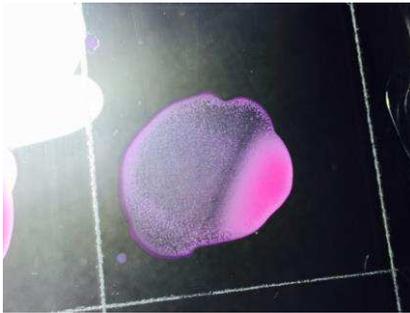
Para a soroaglutinação foram utilizados o teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou Card Test, de acordo com Nicoletti (1969), Alton et al. (1988) e preconizado pelo MAPA/PNCEBT (BRASIL, 2006) conforme técnica descrita no anexo 01 e apresentada nas Figuras 07, 08, 09, 10 e 11. A interpretação dos resultados fundamentou-se na presença de grumos (animais reagentes) e na ausência desses (animais não reagentes).



**Figura 7.** Realização do teste de AAT, segundo o protocolo estabelecido por Alton et al. (1988) e preconizado pelo PNCEBT - Fonte: Priscila Alencar (2016)



**Figura 08:** Leitura do teste do AAT e observação de amostras positivas e negativas na placa. – Fonte: Anna Karoline



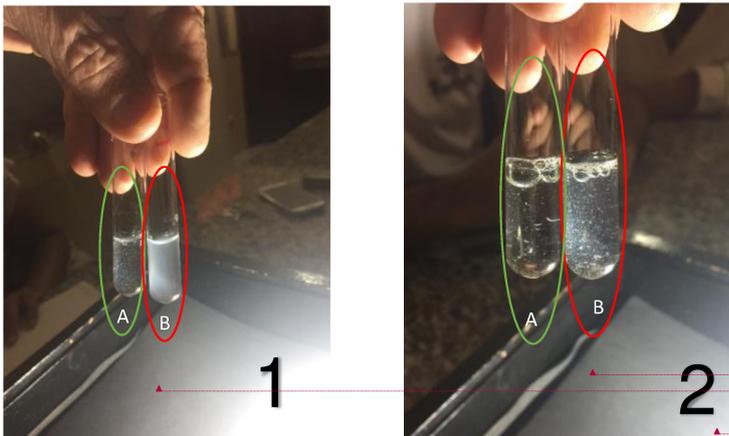
**Figura 09:** Amostra positiva no AAT- Fonte: Anna Karoline **Figura10:** Amostra negativa no AAT- Fonte: Anna Karoline

#### **5.5.2 - 2 Mercaptoetanol (2 ME):**

Para confirmação do diagnóstico foi empregado o teste de 2-Mercaptoetanol (2-ME) em associação com a soroaglutinação lenta (SAL) conforme recomendação do MAPA/PNCEBT (BRASIL, 2006), descrita no Anexo 2 e apresentada nas Figuras 12 e 13.



**Figura 11.** Realização do teste de 2-ME, preconizado pelo PNCEBT. Fonte: Anna Karoline



**Figura 12:** Leitura do teste 2-ME. Em “1” reação inespecífica, onde o tubo “A” é o teste SAT apresentando grumos (reação positiva) e em “B”, a prova do 2-ME, com aspecto translúcido, portanto negativa (ausência de grumos). Em “2” a combinação considerada positiva, onde observa-se em ambos os tubos (A e B) a formação de grumos. Fonte: Anna Karoline

**Formatado:** Cor da fonte: Plano de Fundo 1, Contorno do Texto, Sombra

**Formatado:** Fonte: 36 pt, Cor da fonte: Texto 1, Contorno do Texto, Sombra

**Formatado:** Cor da fonte: Plano de Fundo 1, Contorno do Texto, Sombra

A interpretação dos resultados pautou-se no grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições (1:25; 1:50; 1:100; 1:200), classificada como: completa (+), incompleta (I) ou negativa (-):

- **Reação completa** – é aquela em que o líquido da mistura soro-antígeno aparece translúcido e a agitação suave não rompe os grumos;
- **Reação incompleta** – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;
- **Reação negativa** – é aquela em que a mistura soroantígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

A interpretação dos resultados da prova foi realizada segundo as normas do PNCEBT (MAPA, 2016) descritas nos Quadros 1 e 2.

**Quadro 1.** Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade. Teste de soroglutinação lenta (UI/ml) Teste do 2-ME (UI/ml). Interpretação:

Teste de soroglutinação lenta (UI/mL)	Teste do 2-ME (UI/mL)	Interpretação
£ 50	< 25	negativo
³ 100	< 25	inconclusivo
³ 25	³ 25	positivo

UI - Unidade Internacional

**Quadro 2.** Interpretação do teste do 2-ME para machos e para fêmeas com idade superior a oito meses, vacinadas com RB51 ou não vacinadas. Interpretação:

Teste de soroglutinação lenta (UI/mL)	Teste do 2-ME (UI/mL)	Interpretação
£ 25	< 25	negativo
³ 50	< 25	inconclusivo
³ 25	³ 25	positivo

UI - Unidade Internacional.

### **5.6 Questionário**

Foi aplicado um questionário epidemiológico (Anexo 03), com os proprietários para obter informações referentes às propriedades, aos animais e ao manejo empregado para realizar o estudo dos possíveis fatores de risco associados à brucelose.

As variáveis analisadas no questionário epidemiológico foram: (i) tipo de criação; (ii) tipo de ordenha; (iii) vacinação contra Brucelose.; (iv) realização de exames de Brucelose; (v) compra e venda de animais com exames; (vi) houve aborto na propriedade; (vii) motivo da venda dos animais; e, (viii) possui assistência médico veterinária na propriedade.

Para o estudo da associação entre a soropositividade e as variáveis analisadas foi utilizado o teste exato Fisher ou teste Qui-quadrado, quando as condições para o teste de Fisher não foram verificadas. O nível de significância utilizado foi 5% (0,05) e intervalos com confiabilidade de 95%. O programa estatístico utilizado foi o InStat 3.0 versão 2008. Foi realizada a análise univariada dos dados pelos testes estatístico de Fisher e Qui-quadrado ( $P \leq 0,05$ ).

## **6. RESULTADOS E DICUSSÃO**

Foram analisadas 1.265 amostras de soro bovino, das quais 1.173 foram provenientes do estado do Maranhão e 92 do estado do Pará. Do total de amostras analisadas, 39 foram reagentes no AAT e 15 destas foram confirmadas no 2-ME. Desta forma, obteve-se uma prevalência de brucelose bovina em matadouro no estado do Maranhão de 1,19% ( $n=15/1.265$ ).

Das 415 amostras oriundas do matadouro com Serviço de Inspeção Federal de Imperatriz, 12 foram reagentes ao teste AAT e oito positivas ao 2-ME. Das 300 amostras do matadouro com Serviço de Inspeção Federal do município de Açailândia, apenas uma foi reagentes ao teste AAT. Das 300 amostras do matadouro com Serviço de Inspeção Municipal de Imperatriz, 24 reagiram ao teste AAT e sete positivas no 2-ME e das 250 amostras do matadouro com Serviço de Inspeção Municipal de Açailândia, duas foram reagentes ao teste AAT. A quantidade de

amostras coletadas por estabelecimento, município e os respectivos resultados da sorologia estão sumarizados no Quadro 03.

**Quadro 03.** Quantidade de amostras analisadas de acordo com o município, o serviço de inspeção e os resultados da sorologia.

Matadouro	Município	Amostra	Testes Laboratoriais			
			Nº	AAT %	Nº	2-ME %
SIF	Imperatriz	415	12	0,94	08	0,63
	Açailândia	300	01	0,07	00	0
SIM	Imperatriz	300	24	1,89	07	0,55
	Açailândia	250	02	0,15	00	00

Das 15 amostras confirmadas no teste 2-ME, obteve-se a seguinte titulação: cinco amostras apresentaram título 1/25, nove amostras título 1/50 e uma amostra título 1/100.

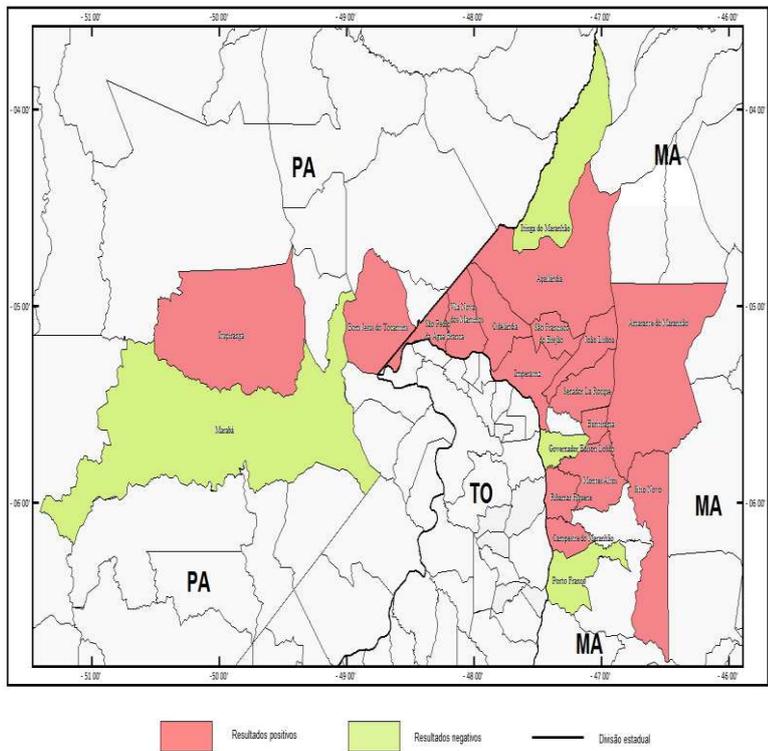
No Quadro 04 está sumarizada a quantidade de amostras por município de origem, bem como o resultado dos testes laboratoriais. Das 92 amostras provenientes de animais do estado do Pará, apenas uma amostra foi reagente no AAT e confirmada no 2-ME. A totalidade das amostras reagentes e positivas para brucelose foi oriunda de amostras maranhenses.

**Quadro 04.** Resultado sorológico das amostras de soro bovino submetidas aos testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e ao teste do 2 Mercaptoetanol (2-ME) de acordo com a origem no período de outubro de 2015 a setembro de 2016.

MUNICÍPIO DE ORIGEM	QUANTIDADE	POSITIVO AAT	POSITIVO 2 ME
AÇAILÂNDIA – MA	168	02	--
ITUPIRANGA – PA	33	01	01
GOV. ED. LOBÃO – MA	25	--	--
MARABÁ – PA	39	--	--
BURITIRANA – MA	23	02	02
SÃO PEDRO DA AGUA BRANCA – MA	60	01	--
CAMPESTRE DO MARANHÃO – MA	110	02	--
SÃO FRANCISCO DO BREJÃO – MA	80	03	--
AMARANETE DO MARANHÃO – MA	58	04	--
BOM JESUS DO TOCANTINS – PA	20	--	--
PORTO FRANCO – MA	07	--	--

CIDELÂNDIA –MA	40	02	--
BOM JESUS DAS SELVAS –MA	40	01	--
ITINGA DO MARANHÃO – MA	138	--	--
SENADOR LA ROQUE - MA	75	03	--
VILA NOVA DOS MARTÍRIOS – MA	95	01	--
SÍTIO NOVO – MA	30	03	03
JOÃO LISBOA –MA	55	03	01
RIBAMAR FIQUENE –MA	60	07	05
MONTES ALTOS –MA	40	01	01
IMPERATRIZ –MA	69	04	02
TOTAL	1265	39	15

Na Figura 14, observa-se a distribuição geográfica das amostras reagentes no teste AAT por município.



**Figura 013:** Resultados positivos no teste AAT – Fonte: AGED/IBGE



Pelo observado na comparação entre os testes, identificaram-se diferenças entre os resultados dos testes AAT (39 reagentes) e 2-ME (15 positivos). Conforme descrito no PNCEBT, podem ocorrer casos de reações falso-positivas no AAT em decorrência da utilização da vacina B19 depois da idade recomendada que é de 3 a 8 meses para bezerras, e a presença de anticorpos inespecíficos que estão presentes em infecções por outras bactérias, como *Salmonella sp*, *Escherichia coli* O:157, *Pseudomonas sp*, ou *Yersinia enterocolitica* (BRASIL, 2006).

Ocorreram reações inespecíficas nas amostras testadas nos teste do 2-ME e SAL, possivelmente associadas a vacinações após o período preconizado pelo PNCEBT. Apesar da vacinação contra brucelose na área estudada ser obrigatória, é provável que a imunização do rebanho não ocorra conforme estabelecido oficialmente.

Dentre as amostras coletadas, 689 eram de machos e 576 de fêmeas. Das amostras de macho testadas, apenas uma foi reagente no AAT e confirmada no 2-ME. Referente às fêmeas, 38 amostras foram reagentes no AAT e 14 foram positivas no 2-ME (Quadro 05).

**Quadro 05.** Resultados sorológicos de amostras séricas de machos e fêmeas por município de origem.

ANIMAIS	IMPERATRIZ			AÇAILÂNDIA			
	Nº	AAT	2 ME	MACHOS	Nº	AAT	2 ME
MACHOS	339	01	01		FÊMEAS	350	00
FÊMEAS	376	35	14	Nº		AAT	2 ME
TOTAL	715	36	15	TOTAL	550	03	00

Comparando os resultados encontrados nas amostras de fêmeas em relação ao Serviço de Inspeção observou-se que das 38 fêmeas reagentes no teste do AAT, 13 eram provenientes do SIF e 25 do SIM. No teste confirmatório, foram identificadas oito amostras positivas no SIF e seis no SIM, com todos os animais precedentes do estado do MA. Encontrou-se apenas 01 macho positivo nos testes e

este foi abatido em matadouro sob SIM de Imperatriz e oriundo do município de Itupiranga – PA.

No Quadro 06 estão descritos o total de machos e fêmeas amostradas no estudo de acordo com o serviço de inspeção e o município de origem.

**Quadro 06.** Total machos e fêmeas amostradas de acordo com o Serviço de Inspeção e Município de origem

SERVIÇO DE INSPEÇÃO	IMPERATRIZ		SERVIÇO DE INSPEÇÃO	AÇAILÂNDIA	
	MACHOS	FÊMEAS		MACHOS	FÊMEAS
FEDERAL	235	180	FEDERAL	250	50
MUNICIPAL	104	196	MUNICIPAL	100	150
TOTAL	339	376	TOTAL	350	200

Freitas e Oliveira (2005) e por Santos (2007) relatam que a prevalência de brucelose é maior em fêmeas quando comparado aos machos o que corrobora com o estudo.

No Quadro 07, estão sumarizados os resultados sorológicos identificados no estudo de acordo com o serviço de inspeção e municípios de origem das amostras.

**Quadro 07.** Resultados sorológicos das amostras de soro bovino de acordo com o Serviço de Inspeção nos matadouros e municípios de origem.

MUNICÍPIO	INSPEÇÃO FEDERAL					INSPEÇÃO MUNICIPAL				
	Nº	AAT (+)	%	2 ME (+)	%	Nº	AAT (+)	%	2 ME (+)	%
IMPERATRIZ	415	12	0,94	08	0,63	300	24	1,89	07	0,55
AÇAILÂNDIA	300	01	0,07	--	--	250	02	0,15	--	--

Todas as amostras foram coletadas de animais que não apresentavam nenhuma indicação ou sinais clínicos sugestivos de brucelose nos exames ante-

mortem ou de positividade da brucelose em exames sorológicos anteriores. Esses resultados, juntamente com os obtidos por Viana (2010) que identificou prevalência de 16,8% bovinos sem sinais sugestivos de doença, reforçam a importância de estudos em matadouros como fonte de dados epidemiológicos.

Durante coleta aleatória, se verificou que 15 animais apresentavam lesões sugestivas de brucelose (bursite), com aspecto granulomatoso, de forma irregular, variável de tamanho, contendo ou não líquido, identificada durante a inspeção de carcaças na sala de abate. Essas amostras não coincidiram com as amostras séricas coletadas aleatoriamente na etapa da sangria. Após coleta do material (bursite e soro sanguíneo), acondicionamento das amostras e análise laboratorial do soro sanguíneo, observou-se que as 15 amostras de soro dos bovinos com bursite, apenas uma foi positiva ao teste do 2-ME. Esse dado é inferior ao encontrado por Freitas e Oliveira (2005) que encontraram 100% de reação nos animais com bursites e por Almeida (2000) que encontrou 13,3%.

Freitas e Oliveira (2005) constataram relação entre as lesões de bursite e a soropositividade da brucelose. Almeida (2000) relata que animais positivos para brucelose apresentam presença de fibrina nas bursites; já os soronegativos apresentam lesões purulentas ou com nódulos. Esteves (2013) relata sobre a importância das bursites como lesões sugestivas da doença e sobre a possibilidade de estar relacionada com a presença de outros micro-organismos como agentes causadores das lesões e Santos et al. (2016) atribui casualidade na presença de lesões e não associa esta à doença.

O RIISPOA (BRASIL, 1952) cita em seu artigo nº 163 que devem ser condenadas as carcaças com lesões extensas de brucelose e que em casos de lesões localizadas, encaminha-se a esterilização pelo calor depois de removidas as partes atingidas. A IN nº 19\2016 que atualiza o regulamento do PNCEBT cita que as carcaças de animais sabidamente positivos que não apresentem lesões devem ser liberadas para o consumo, sendo condenados apenas o úbere, útero, anexos do trato genital, miúdos e sangue.

Como descrito por Santos et al (2016), há carência de pesquisas referentes ao diagnóstico de brucelose, principalmente em animais destinados ao abate. Animais apenas com a presença das lesões não devem ser considerados positivos, assim

como animais que não apresentem nenhum tipo de lesão ser considerados negativos. Esteves (2013) relata que a presença de lesões não é suficiente para atender as exigências sanitárias visto que há um elevado número de animais que são positivos e não apresentam nenhuma lesão característica da doença.

A análise univariada (Quadro 08), demonstrou que as variáveis ocorrência de abortamento nas propriedades, venda de animais sem exames de brucelose e a não realização de exames periódicos para brucelose nas propriedades estão associados estatisticamente à ocorrência da doença ( $P < 0,05$ ).

**Quadro 08.** Fatores de risco associados à brucelose em bovinos abatidos em matadouros com SIF e SIM Nas regionais de Açailândia e Imperatriz.

Variáveis		Brucelose								OR	IC 95%	Valor de P
		Reagentes		Não Reagentes		Total						
		N	%	N	%	N	%					
Tipo de criação	Corte	08	7	86	72	94	78	2,326	0,2773; 19,502	0,6819		
	Leite	01	1	25	21	26	22					
Tipo de ordenha	Manual	00	0	20	17	20	17	0,234	0,0131; 4,204	0,2349		
	Não possui	09	8	91	76	100	83					
Realiza exames de Brucelose	Sim	02	2	91	76	93	78	0,0627	0,0121; 0,3253	0,00004*		
	Não	07	6	20	17	27	23					
Compra animais com exames	Sim	03	3	48	40	51	43	0,6563	0,1561; 2,759	0,7314		
	Não	06	5	63	53	69	58					
Vende com exames	Sim	00	0	45	38	45	38	0,0769	0,0043; 1,356	0,0136*		
	Não	09	8	66	55	75	63					
Houve aborto nos últimos 12 meses	Sim	05	4	11	9	16	13	11,364	2,652; 48,693	0,0021*		
	Não	04	3	100	83	104	87					
Possui assistência Veterinária	Sim	02	2	15	13	17	14	1,829	0,3465; 9,650	0,6135		
	Não	07	6	96	80	103	86					

Onde: OR = Oddsratio  
IC= Intervalo de Confiança

\* = Significância Estatística ( $P \leq 0,05$ )

O abortamento foi considerado fator de risco (OR=11,364; IC=2,652 – 48,693;  $P \leq 0,0021$ ) no presente estudo. Mota (2011) cita como fator de risco a manifestação de sinais clínicos da brucelose, entre eles o abortamento e o nascimento de bezerros fracos.

A variável venda de animais sem exames mostrou-se como fator de risco no estudo (OR=0,0769; IC=0,004 – 1,356;  $P \leq 0,0136$ ). O comércio de animais entre propriedades vizinhas sem realização de exames favorece a circulação da brucelose na região estudada. Mota (2011) destaca que o verdadeiro problema da brucelose é a aquisição de animais sem cuidados sanitários, ou seja, sem a realização de testes ou o conhecimento da condição sanitária do rebanho de origem.

Outra variável que se mostrou como fator de risco no estudo, foi a não realização de exames de rotina nos rebanhos (OR=0,0627; IC=0,012 – 0,325;  $P \leq 0,0004$ ). A ausência destes testes nos rebanhos dificulta ao proprietário a obtenção de informações sobre a sanidade do rebanho, não possibilitando a realização de medidas sanitárias adequadas.

Ao se analisarem os dados encontrados verificaram-se conforme já relatado por Dutra (2015) e por Rocha (2016), que um dos principais problemas para a ocorrência da brucelose nos rebanhos bovinos no estado do Maranhão, ocorre pela falta de informações na aquisição de animais sem exames e no controle de animais positivos, os manejos sanitário e reprodutivo e o tipo de sistema de produção implementado nas propriedades rurais. Rocha (2016) e Borba (2012) destacam também a ausência de assistência veterinária nas propriedades que representa um importante entrave no controle de problemas sanitários dos rebanhos.

A vigilância epidemiológica dos animais deve ser considerada, também, como um fator de controle da brucelose, pois se identificou, através dos documentos sanitários que acompanham o trânsito dos animais, que entram animais de outros estados e que assim como os oriundos do Maranhão, estes são declarados como

oriundos de propriedade com registro de vacinação, porém, os animais em questão não possuem nenhum tipo de informação sobre essa situação.

Viana (2010) identifica que o principal fator de risco aos funcionários dos matadouros ocorre principalmente devido à ausência de informações sobre a sanidade dos animais. Nociti (2008), relata que o contato com animais brucélicos em estabelecimentos de abate durante a inspeção ou exames de rotina foi responsável por 67% da contaminação destes em matadouros. Schneider (2013) encontrou prevalência de 4,5% para brucelose em colaboradores, afirmando que o abate de animais brucélicos é um fator de risco considerável para a transmissão da enfermidade aos humanos.

Nos estabelecimentos onde foram coletadas as amostras, observou-se que o uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) pelos funcionários diminui consideravelmente a possibilidade de contaminação, entretanto não elimina o risco de infecção destes funcionários.

Apesar da obrigatoriedade da vacinação das fêmeas, foi identificado que a ausência de exames que comprovem a ausência de brucelose nos animais antes do abate pode ser considerada um alto risco aos funcionários ligados ao abate dos animais, médicos veterinários, magarefes e ao consumidor visto que apenas a presença de lesões sugestivas não descarta a presença da Brucelose nas carcaças de bovinos conforme já descrito no RIISPOA (BRASIL, 1952).

O PNCEBT no estado do MA executado pela AGED realiza diversas ações conforme determina o programa e além destas destaca se as supervisões junto às ULSAVS, nas propriedades e junto aos médicos veterinários habilitados e cadastrados no Programa. Segundo o setor, foram realizadas diversas vacinações em bezerras na idade preconizada e cursos para vacinadores, principalmente nos municípios de baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Foi relatado também, que o principal entrave encontrado ocorre devido a não notificação dos animais positivos pelos Médicos Veterinários cadastrados e/ou habilitados, assim como a notificação dos animais suspeitos/ positivos pelos matadouros.

## 7. CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados, conclui-se que a infecção por *Brucella abortus* em animais abatidos em matadouros sob Serviços de Inspeção Federal e Municipal nos municípios de Imperatriz e Açailândia do estado do Maranhão está presente, e ocorre com maior frequência em fêmeas abatidas. Os principais fatores de risco para a doença são a ocorrência de abortamentos nas propriedades, a venda de animais sem exames e a não realização de exames que testem os animais antes da inclusão nos rebanhos e antes do abate.

A vigilância epidemiológica da brucelose em frigoríficos deve ser mais atuante e poderia ser aplicadas técnicas de sorologia para diagnósticos confiáveis como controle de qualidade da carne bovina e para garantir a saúde dos colaboradores e Médicos Veterinários que trabalham em estabelecimentos de abate, assim como para evitar que a população consuma carne contaminada. As informações sobre animais suspeitos deveriam ser comunicadas aos serviços veterinários oficiais imediatamente por todos os estabelecimentos e não apenas os que apresentem resultados positivos posteriores ao abate.

Para o controle da doença, é essencial que ocorra o diagnóstico preciso, a eliminação dos animais positivos e a vacinação de forma correta nas idades adequadas.

## REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Acesso em: 30 out. 2016. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp)>.
- AGED/MA. **Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão**. Disponível em: <<http://www.aged.ma.gov.br>>. Acesso em 18 de outubro de 2016.

- AIMEIDA, L. P.; REIS, D. O.; GERMANO, P.M.L: **Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob inspeção federal.** Revista Ciência Rural, vol.30, no.2, Santa Maria Mar./Apr. 2000 disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782000000200015>. Acesso em 18 de maio de 2015.
- ALTON, G. G.; MAW, J.; ROGERSON, B. A. et al. **The serological diagnosis of bovine brucellosis: na evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose Bengal test.** Australian Veterinary Journal, Australia, v. 51, p. 57-63, 1976.
- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. **Techniques for the brucellosis laboratory.** Paris: Institut National de La Recherche Agronomique, 1988.
- BORBA, M.R.; **Caracterização epidemiológica da Brucelose bovina no estado do Maranhão. 2012.** Tese doutorado na Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina veterinária Preventiva e saúde Animal, São Paulo, 2012. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-09102012-151041/fr.php>. Acesso em 12 de maio de 2015.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** (Riispoa), Decreto nº 30.691/1952. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf) acesso em: 10 de Maio de 2015.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

(PNCEBT). **Inquérito Soro epidemiológico da Brucelose: Manual de Procedimentos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2001. 24 p.

- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Bovina (PNCEBT)** Brasília: MAPA/SDA/DSA 2006. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal/programas/prog-nacional-controle-erradicacao-brucelose-tube>. Acesso em 10 de maio de 2015.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **SIG SIF** Quantitativo de Animais Abatidos por Categoria e UF no ano . Disponível em: [http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif\\_cons!/sigsif.ap\\_quant\\_abate\\_cat\\_rep\\_cons](http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons!/sigsif.ap_quant_abate_cat_rep_cons). Acesso em 10 de outubro de 2016.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Bovina (PNCEBT)** Instrução Normativa nº 19, de 10 de Outubro de 2016. Brasília: MAPA/SDA/DSA 2016. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=7&data=03/11/2016> acesso em 10 de Novembro de 2016.
- CAVALCANTE, Anny Castro Lustosa; MARTINS, Greyson Wilson Ferreira; PEDROSA, Karlos Yuri Fernandes. **Prevalência da brucelose em bovinos suspeitos abatidos nos frigoríficos da região metropolitana de São Luís no período de 2006 a 2010**. Seminário de Pesquisa (Especialização em Vigilância em Saúde) – Curso Vigilância em Saúde, Universidade Estácio de Sá / Instituto Laboro, São Luís, 2011.
- CARVALHO, R. F. B. "**Brucelose: frequência, georreferenciamento de focos, fatores de risco em rebanhos bovinos e em seres humanos envolvidos na cadeia produtiva do leite na região do Médio Mearim,**

**Maranhão, Brasil" Dissertação** (Mestrado em Defesa Sanitária Animal). Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014. Disponível em <http://www.mestradosda.uema.br/>. Acesso em 12 de maio de 2015.

- CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- COSTA, Jader Protásio. **Brucelose: antropozoonose**. Trabalho de Conclusão e Curso. (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário de Formiga – UNIFOR, Formiga, MG, 2010.
- DIAS, I.C.L. **Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos**. Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI.,v.8, n.15, p.89-98,ISSN:1809-1636, out. 2012. Disponível em: [http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero\\_015/artigos/pdf/Artigo\\_07.pdf](http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero_015/artigos/pdf/Artigo_07.pdf). Acesso em 10 de maio de 2015.
- DUTRA, M. C. C. **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA BRUCELOSE BOVINA NO ESTADO DO MARANHÃO NO PERÍODO DE 2008 A 2014**. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015. Disponível em: <http://www.cienciaanimal.uema.br/images/diss/diss-2015/maria%20cristina.pdf> acesso em 17 de Maio de 2016.
- ESTEVES, C.; ARAÚJO, M.M.B.; FARIA, P. B.; MASCARENHAS, D. R.; FARIA, J.H.; **Bursite cervical em bovinos e sua correlação com a Brucelose** XXII Congresso de pós graduação da UFLA, 2013. disponível em: [http://www.apg.ufla.br/resumos/resumo\\_2013/anais/resumo\\_9\\_244\\_1.pdf](http://www.apg.ufla.br/resumos/resumo_2013/anais/resumo_9_244_1.pdf). Acesso em 15 de maio de 2015.
- FERREIRA NETO, J.S. **Situação epidemiológica da Brucelose bovina no Brasil: Bases para as intervenções**. Disponível em:

[www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/7669/5442](http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/7669/5442). Acesso em 12 de maio de 2015.

- FIGUEIREDO, A. O.; **Diagnóstico sorológico da Brucelose bovina**, 2008 Campo Grande MS disponível em: <http://qualittas.com.br/uploads/documentos/Diagnostico%20Sorologico%20da%20Brucelose%20Bovina%20-%20Aline%20de%20Oliveira%20Figueiredo.PDF>. Acesso em 18 de maio de 2015.
- FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P. **Pesquisa de Infecção Brucélica em Bovídeos Abatidos Portadores de Bursite**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.4, p.427- 433, 2005. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72\\_4/freitas.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72_4/freitas.PDF). Acesso em 18 de maio de 2015.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária - Outubro de 2016. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao\\_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201002\\_publica\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201002_publica_completa.pdf). Acesso em: 30 de Outubro de 2016.
- LAGE, A. P. POESTER, F. P. PAIXÃO, T. A. SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S; MIRANDA, K. L.; ALVES, C.M. MOL, J. P. S.; SANTOS. R. L. **Brucelose bovina: uma atualização**. Rev. Bras. Reprod. Animal, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20v2%20pag202-212.pdf> acesso em 30/10/2014.
- LANGENEGGER, J., SECCHIN, H., BAPTISTA, A.M. **Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro**. Pesq Agropec Bras Ser Vet, v.10, p.45-49, 1975.

- LAURIA, I. E.N.; **Identificação de *Brucella* spp. por técnicas moleculares em carcaças de bovinos com lesões sugestivas de brucelose**, 2012, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa de mestrado em ciência animal disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/947146>. Acesso em 18 de maio de 2015.
- LIMA, C. A. A. **Diagnóstico soroepidemiológico da *Brucella abortus* na microrregião de Imperatriz – MA**. Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.
- LOPES, C. A. R.; **Prevalência de Brucelose e Tuberculose em bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Aracruz – Espírito Santo**. Dissertação (Curso de pós-graduação *Latu sensu* em Higiene e Inspeção de produtos de Origem Animal), Universidade Castelo Branco (Especialização em Higiene e Inspeção de produtos de Origem Animal).
- LLANO, Horwald Alexander Bedoya. **Revisão e situação atual da brucelose e leptospirose em bovinos no Brasil e na Colômbia**. Seminário (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- MAFRA, P. **Impacto da brucelose no ambiente e saúde pública – estratégias de controle em zonas endêmicas**. Ciências da Natureza. 2008. Disponível em: <http://www.catraios.pt/profs/salarecursos/matchn/brucelose.pdf>. Acesso em: 18 de maio de 2015.
- MARTINHO, F. S.; JUNIOR, F. G. S.; JUNIOR, D. S. S.; SANTOS, M. F.; GOMES, W. M.; CASTILLO, L. A. C. **Diagnóstico da Brucelose em bovinos no abatedouro municipal de Imperatriz – MA**. Revista Agroecossistemas, v. 3, n. 1, p. 41-44, 2011.

- MARTINS, A. P. N.; **Correlação entre prevalência de Brucelose e condenações por bursite cervical em bovinos abatidos sob inspeção federal no estado do Mato Grosso.** Dissertação (Mestrado em higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal) Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Disponível em: <http://docs.academicoo.com/user/anapmartins/tese-de-mestrado-ana-paula.pdf>. Acesso em 18 de maio de 2015.
- MINERVINO, Antonio Humberto Hamad; **Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no Estado do Pará.** Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.1, p.47-53, 2011.
- Meirelles-Bartoli R.B.; Mathias L.A. **ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES ADOTADOS PELO PNCEBT PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA BRUCELOSE EM BOVINOS.** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, jan./mar., 2010.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; JUNIOR, G. M.; CROCCI, A. J. **Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina.** *Revista Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol.37 no.5 São Paulo 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962000000500009> acesso em 20 de maio de 2016
- MIONI, M. de S. R. **Soroprevalência da brucelose bovina em frigoríficos com diferentes níveis de serviço de inspeção no estado de São Paulo.** 2015. 49 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/132107>>. Acesso em 20 de maio de 2016.

- Molnár L. ; Molnár E.;Lima E. S. C.; DIAS, H.L.T **Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina** Pesq. Vet. Bras. 22(2):41-44, abr./jun. 2002
- MOTA, A.L.A.A. **Fatores de Risco para Brucelose Bovina no Brasil.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília, 2011, 73p.
- NICOLETTI, P. Further **evacuations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis.** American Journal of Veterinary research, Chicago, v. 30, p. 1811 – 1816, 1969.
- Nociti, R. P.; Nociti, D. L. P; Silva, G. C. P. da; Avila, M. O. **FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À BRUCELOSE EM MÉDICOS VETERINÁRIOS COM PREDISPOSIÇÃO OCUPACIONAL NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL.** Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/r0630-1.pdf>. Acesso em 10 de Junho de 2015.
- OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code.** 2013. Chapter 11.3. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2009/en\\_chapitre\\_1.11\\_3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11_3.htm). Acesso em 10 de Junho de 2015.
- OLIVEIRA, L. B.; SANTOS, I. N. N.; CRUZ, R. S.; CAMARGO, M. E.; RUSSO, S.L. **Prospecção Tecnológica sobre a Brucelose Bovina.** Revista GEINTEC.NET. Anais SIMTEC – ISSN: 2318-3403. Aracaju/SE – 25 a 27/09/2013. Vol. 1/n. 1/ p. 77-87. Disponível em: <http://www.revistageintec.net/portal/index.php/revista/article/view/313/363>. Acesso em 10 de maio de 2015.

- OLIVEIRA, J. P. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em bovinos e bubalinos abatidos para consumo**. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Aspectos higiênicosanitários da carne. Zoonoses mais comuns adquiridas profissionalmente por manipuladores de carne**. In: Ciência, higiene e tecnologia da carne, 2 ed.,Goiânia: CEGRAF-UFG/ Niterói: EDUFF, 2006. p. 358-359.
- PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. **Brucelose em búfalos**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, [online], v. 75, n. 3, p. 389-401, jul./set., 2008. Disponível em:[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75\\_3/paulin.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_3/paulin.pdf). Acesso em: 30 de Outubro de 2014.
- PAULIN, L. M.S.; **O controle da brucelose em bovinos** disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=69](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=69). Acesso em 18 de maio de 2015.
- PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J. S. **O combate á brucelose bovina: situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154p.
- PAULIN, L.M. **Artigo de revisão – brucelose**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, 2003.
- PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. **Medicina Interna**, Lisboa, [online], v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>.
- POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P.; ROXO, E.; MOTA, P.M.P.C.; MÜLLER, E.E.; FERREIRA NETO,

J.S. **Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.1-5, nov. 2009, ISSN 0102-0935. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352009000700001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000700001). Acesso em 12 de maio de 2015.

- PRAZERES, M.P.C.S. **Soroprevalência da brucelose e identificação dos fatores de riscos para rebanho bovino no município de São Francisco do Brejão no Estado do Maranhão.** 2009. 103f. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2009.
- ROCHA ALENCAR, R. D. **Brucelose: Epidemiologia e fatores de risco da *Brucella abortus* no rebanho bovino do sudoeste maranhense.** Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016. Disponível em: <http://www.cienciaanimal.uema.br/images/diss/diss-2016/reylan.pdf> acesso em 15 de outubro de 2016.
- ROMANI, A. F.; **Investigação soropidemiológica e molecular de Brucelose e Leptospirose em núcleos de conservação de gado curraleiro pé duro e pantaneiro.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.
- SANTANA, S.S. **Soro epidemiologia da *Brucella abortus* em Rebanhos Bovinos na Região do Cerrado do Estado do Maranhão.** 2010.82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.
- SANTOS, H.P.; TEIXEIRA, W. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; PEREIRA, H.M.; OLIVEIRA,R.A.; NEGREIROS, R. C.; SOARES FILHO, P.M.; SANTANA, S.S.;

CASTRO, R. S. **Brucelose Bovina e Humana Diagnosticada em Matadouro Municipal de São Luís -MA, Brasil.** Ciênc. Vet. Tróp., Recife-PE, v. 10, n. 2/3, p. 86 - 94 , 2007.

- SANTOS, R. P. S. ; DENADAI, L. B.; SOUSA, D. R. S.; DONATELE, D.M. **Lesões cervicais granulomatosas não estão associadas a brucelose bovina no sul do estados do Espírito Santo, Brasil.** Revista PUBVET, v.10, n.9, *In Press*, Set., 2016 Disponível em XXXXXXXX, acesso em 20 de outubro de 2016.
- SCHNEIDER, R.C.; SANTOS, M.D.; LUNARDI, M.; BENETTI, A.H.; CAMARGO, L. M.; FREITAS, S.H.; NEGREIRO, R.L.; COSTA,D.S. **Prevalência da brucelose e fatores de risco associados a sua transmissão em trabalhadores de indústria frigorífica da região metropolitana de Cuiabá, Mato Grosso.** Semina: Ciência Agrária, Londrina, v.34, n 5, p.2367 - 2374, set/out.2013. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/13558>. Acesso em 14 de setembro de 2015.
- SOLA, C.M. **Emprego da Técnica de PCR em Tempo Real na Detecção de Dna de *Brucella* spp em Lesões de Carcaças e Vísceras Provenientes de Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal.** 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade Federal de Goiás e Escola Veterinária de Zootecnia, UFG, Goiânia. Disponível em: < <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/847>. Acesso em 12 de maio de 2015.
- SOLA, C.M.; Freitas, F.A. DE; Sena, E.L.S.; Mesquita, A.J.M. ; **BRUCELOSE BOVINA: REVISÃO ENCICLOPÉDIA BIOSFERA,** Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 686, 2014.
- TRIOLA, Mário F. **Introdução à Estatística.** 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

- UFLA. **Rastreabilidade e Segurança Alimentar**. Boletim Técnico, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. Lavras: UFLA, n. 91,25p., 2012.
- VIANA, L.; BAPTISTA, F.; TELES, J.; RIBEIRO, A.P.C.; PIGATTO, C.P. **Soropositividade e lesões sugestivas de Brucelose em bovinos abatidos no estado do Tocantins, Brasil**. Arquivo do Instituto Biológico. São Paulo, v.77, n.3, p. 517-520, jul/set., 2010 Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_3/viana.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/viana.pdf). Acesso em 18 de maio de 2015.
- XAVIER, M. N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos** [online]. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta\\_\\_o\\_mnx\\_final.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta__o_mnx_final.pdf).

## **Anexos**

### ANEXO 01

#### **a) Antígeno Acidificado Tamponado (AAT):**

- 1) Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura ambiente, no mínimo por 30 minutos. Caso os soros estivessem congelados, o período de equilíbrio à temperatura ambiente deveria ser maior. Homogeneizar os soros antes de realizar a prova.
- 2) Preencher os protocolos de prova, identificando a localização de cada soro.
- 3) Ao utilizar o micropipetador de 30  $\mu\text{L}$  ou a pipeta de Bang dotada de uma pêra de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem, dispensar 30  $\mu\text{L}$  (ou da marca de 0,04 até 0,01 na pipeta de Bang) de soro por área da placa de Hudledson; depositar essa quantidade sobre e em contato com a placa de vidro em ângulo de 45°.
- 4) Agitar suavemente o antígeno e depositar uma gota (30  $\mu\text{L}$ ) ao lado do soro, sem ser nele misturado.
- 5) Homogeneizar, por meio de homogeneizador simples ou múltiplo, o soro e o antígeno com movimentos circulares, de modo a obter um círculo aproximado de 2 cm.
- 6) Agitar a placa com movimentos oscilatórios, numa frequência de, aproximadamente, 30 movimentos por minuto, de modo a permitir que a mistura soro-antígeno flua lentamente dentro de cada círculo; a placa deve ser agitada continuamente por 4 minutos.
- 7) Repousar a placa na caixa de leitura com luz indireta e realizar a leitura.
- 8) Anotar os resultados.
- 9) Desconsiderar as reações de aglutinação que ocorrerem após os 4 minutos.

## ANEXO 02

### **b) 2- Mercaptoetanol (2-ME):**

- 1) Diluir o antígeno para soroaglutinação lenta em tubos 100 vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol, Com concentração final 0,045.
- 2) Diluir o antígeno para soroaglutinação lenta em tubos 50 vezes em solução salina a 0,85% sem adição de fenol com concentração final 0,090%.
- 3) Preparar solução de 2-ME a 0,1 M misturando-se 7,8 mL de 2-ME a 992,20 mL de solução salina a 0,85% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente.
- 4) Para cada amostra de soro a testar, colocar, em uma estante, duas fileiras de quatro tubos.
- 5) Identificar o primeiro tubo de cada fileira com o número correspondente ao soro a testar.
- 6) A primeira fileira corresponde às quatro diluições do soro do teste de soroaglutinação lenta em tubos e deve ser marcada com uma letra T. A outra fileira, em que se fará o teste do 2-ME, deve ser marcada com a letra M.
- 7) Com uma pipeta de Bang, dotada de uma pêra de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, aspira-se o soro até passar um pouco da graduação superior.  
Com um papel absorvente, se limpa o extremo da pipeta; mantendo-a em posição vertical sobre a parede do tubo que contém a amostra, deixa-se escorrer o soro até que o fundo do menisco no interior da pipeta esteja nivelado com a sua graduação superior.
- 8) Com a pipeta no fundo do primeiro tubo da primeira fileira, deixa-se fluir 0,08 mL de soro. No segundo tubo, deposita-se 0,04 mL, no terceiro, 0,02 mL e no quarto, 0,01 mL.
- 9) Repete-se o procedimento descrito para depositar as mesmas quantidades de soro na segunda fileira de tubos (série do 2-ME).
- 10) Para todas as amostras de soro, repete-se o procedimento de forma similar, pipetando os soros para cada duas fileiras de tubos adequadamente identificados.
- 11) Incluir os soros controle positivos com atividade aglutinante conhecida.
- 12) Incluir o soro controle negativo no teste do 2-ME.

13) Com o dispensador automático de 2 mL ou pipeta de 10mL, agregam-se a cada um dos quatro tubos das fileiras T, 2 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em salina fenicada (0,5% de fenol).

14) Com o dispensador automático de 2 mL (regulado para 1 mL), ou pipeta de 10 mL, agrega-se 1 mL de solução de 2-ME 0,1 M (diluído em solução salina sem fenol) a cada um dos tubos das fileiras M.

15) Mistura-se bem, agitando a estante.

16) Deixar as estantes com as amostras em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente.

17) Após os 30 minutos, empregando-se outro dispensador automático, ou outra pipeta de 10mL, agrega-se a cada tubo da fileira M, 1 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09 % de células) em solução salina fisiológica (sem fenol). A concentração final do antígeno na solução será 0,045% e a do 2-ME será de 0,05M.

18) Mistura-se bem, agitando a estante.

19) Incubar a 37°C por  $48 \pm 3$  horas.

20) A leitura do teste é realizada através de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma forte luz que atravesse os tubos. As fontes de luz estranhas devem ser reduzidas.

As interpretações baseiam-se no grau de aglutinação do antígeno e na firmeza dos grumos, após agitação suave dos tubos.

21) Anotar os resultados. Se houver interesse na determinação do título final de um soro, poderá ser empregado o método de diluições seriadas (dobradas).

### ANEXO 03

#### QUESTIONÁRIO BRUCELOSE

1. MUNICIPIO DE LOCALIZAÇÃO DA PROPRIEDADE:
2. TIPO DE CRIAÇÃO: ( ) CORTE ( ) LEITE ( ) MISTA
3. TIPO DE ORDENHA: ( ) MANUAL ( ) MECÂNICA ( ) NÃO TEM
4. REALIZA VACINAÇÃO DE BRUCELOSE: ( ) SIM ( ) NÃO
5. REALIZA EXAMES PERIODICOS DE BRUCELOSE: ( ) SIM ( ) NÃO
6. COMPRA ANIMAIS COM EXAMES: ( ) SIM ( ) NÃO
7. VENDE COM EXAMES: ( ) SIM ( ) NÃO
8. HOVE ABORTO NA PROPRIEDADE: ( ) SIM ( ) NÃO
9. MOTIVO DA VENDA DE FÊMEAS:
10. POSSUI ASSISTÊNCIA VETERINÁRIA NA PROPRIEDADE: ( ) SIM ( ) NÃO