

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

JOSÉ WENDEL ARAUJO SOARES

**FATORES DE RISCO PARA BRUCELOSE BOVINA EM SISTEMA DE CRIAÇÃO  
EXTENSIVA EM MUNICÍPIOS DA BAIXADA MARANHENSE.**

São Luís,  
2020

JOSÉ WENDEL ARAUJO SOARES

**FATORES DE RISCO BRUCELOSE BOVINA EM SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVA  
EM MUNICÍPIOS DA BAIXADA MARANHENSE.**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal PPGPDSA/UEMA, para obtenção do título de Mestre em Defesa Sanitária Animal.

**Orientador: Hamilton Pereira Santos**

São Luís

2020

SOARES, J. W. ARAUJO.

TITULO: BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA EM SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVA:  
análise DE FATORES DE RISCO.

XXF.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação profissional em defesa sanitária animal,  
Universidade Estadual do Maranhão, 2020.

**Orientador: Hamilton Pereira Santos**

1.Brucelose. 2.epidemiologia. 3. Fatores de risco. 4. Saúde pública. I.Título

CDU:

JOSE WENDEL ARAUJO SOARES

**FATORES DE RISCO BRUCELOSE BOVINA EM SISTEMA DE CRIAÇÃO EXTENSIVA  
EM MUNICÍPIOS DA BAIXADA MARANHENSE.**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**

---

**Prof. Dr. Daniel Prazeres Chaves 1º Membro**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**

---

**Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves. 2ª Membro**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**

**Dedico a memória do meu filho Felipe que me ensina, a cada dia, a ser mais humano.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A DEUS PELO GRAÇA DE VIDA.**

**AOS MEUS PAIS, QUE SONHAM ANTES E FIZERAM.**

**A MINHA QUERIDA ESPOSA DIANE E MEU QUERIDO FILHO LEONARDO SEM OS  
QUAIS NÃO CHEGARIA AQUI.**

**AO PROFESSOR DOUTOR HAMILTON PEREIRA SANTOS PORQUE ACREDITOU E  
PELOS ENSINAMENTOS.**

**A MINHA AMIGA RAFISA MARIANA PELA COLABORAÇÃO E INCENTIVO.**

**AOS AMIGOS SEBASTIÃO E NILSON PELA INESTIMAVEL AJUDA NAS COLETAS E  
NAS VIAGENS DIA E NOITE.**

**AOS PROFESSORES E PROFESSORAS DA UEMA QUE SEMPRE FORAM FONTES DE  
ADMIRAÇÃO E INSPIRAÇÃO PRA MIM.**

**AOS COLEGAS DE TURMA QUE TORNARAM O CAMINHO MAIS CURTO E A  
CAMINHADA MAIS PRAZEROSA.**

**A AGED PELO FORNECIMENTOS DOS DADOS COM PRONTIDÃO.**

**A UEMA NA QUAL EU ME SINTO EM CASA.**

**AOS PRODUTORES RURAIS, CUIDADORES, VAQUEIROS E VIZINHOS QUE  
COLABORAM NAS ENTREVISTAS E/OU NAS COLETAS.**

**A TODOS QUE DE ALGUMA FORMA COLABORARAM COM NOSSA PESQUISA  
MINHA GRATIDÃO E RECONHECIMENTO.**

## RESUMO

A brucelose é uma importante zoonose, causada pela bactéria *brucella abortus*, disseminada em todo mundo que acomete bovinos e bubalinos provocando sérios prejuízos econômicos decorrentes de desordens reprodutivas e redução na produção de carne e leite. Os fatores de risco para a enfermidade variam com a região e relacionam-se com a movimentação dos animais e manejo inadequados. Foi realizado um estudo transversal para análise de fatores associados a brucelose em três municípios de estado do Maranhão, Brasil, utilizando um modelo de regressão logística seguido e análise de curva ROC. A coleta de sangue foi realizada em propriedades rurais e abatedouros da região. Para diagnóstico sorológico foi empregado teste de Antígeno acidificado tamponado. Os resultados mostram que 5,1% dos animais e 31,25 % dos rebanhos estavam infectados por *Brucella Abortus*. Os fatores de risco associados a brucelose foram: aquisição de animais (RC=3,3); histórico de aborto (RC=3,1) e tamanho do rebanho maior que 60 cabeças (RC=3,0). O modelo final apresentou um bom ajuste (área sob curva = 0,731, CI 0,627 -0,834) na previsão de casos de bruceloses bovina na população.

## ABSTRACT

Brucellosis is an important zoonosis, caused by the bacterium *brucella abortus*, widespread in the world that affects cattle and buffaloes, causing serious economic losses due to reproductive disorders and reduced meat and milk production. Risk factors for the disease vary with the region and are related to the movement of animals and inadequate handling. A cross-sectional study was performed to analyze factors associated with brucellosis in three municipalities in the state of Maranhão, Brazil, using a logistic regression model followed and ROC curve analysis. Blood was collected from farms and slaughterhouses in the region. For serological diagnosis, a buffered acidified Antigen test was used. The results show that 5.1% of the animals and 31.25% of the herds were infected with *Brucella Abortus*. The risk factors associated with brucellosis were: acquisition of animals (OR = 3.3); history of abortion (OR = 3.1) and herd size greater than 60 heads (OR = 3.0). The final model showed a good fit (area under curve = 0.731, CI 0.627 -0.834) in the forecast of cases of bovine brucellosis in the population



## Lista de Tabelas

Tabela 1 Alguns de fatores associados a brucelose no Brasil, no período de 2001 a 2019.

Tabela 2 Valores literais em tabela 2 X 2

Tabela 3 Dados censitários dos Municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia segundo área, população PIB percapta e IDH

Tabela 4 efetivo de fêmeas com mais 24 meses de idade na área estudada segundo espécies e procedências.

Tabela 5 Distribuição de animais examinados por finalidades e municípios de procedência

Tabela 6 Resultado dos exames de AAT para brucelose por município de procedência.

Tabela 7 Resultado dos exames AAT para brucelose e prevalência por espécie, finalidade e procedência dos animais

Tabela 8 análise univariada de fatores de risco para brucelose em rebanhos bovídeos nos municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia.

Tabela 9 análise multivariada de fatores de risco para brucelose em rebanhos bovinos nos municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia

Tabela 10 Teste de colinearidade entre as variáveis independentes do modelo de regressão logística

Tabela 11 resultado de teste de probabilidade: área sob a curva ROC

## Lista de figuras

Figura 1 exemplo de curva ROC mostrando área sob a curva igual a 0,5

Figura 2 Mapa do Brasil com destaque para o Maranhão

Figura 3 Mapa do Maranhão com destaque para os municípios de Pinheiro, Santa Helena e Tutilândia

Figura 4 Regiões de aceitação e rejeição para o teste do qui-quadrado.

Figura 5 Regiões de aceitação e rejeição para o teste da hipótese

Figura 6 Distribuição da população quanto ao tamanho dos rebanhos e resultado ao teste AAT

Figura 7 Curva ROC do modelo final de regressão logística

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGRAS

2ME – teste de 2-mercapto etanol

AAT teste de antígeno acidificado tamponado

AGED - Agencia de Defesa Agropecuária do Maranhao

AUC área sob a curva ROC

B19 cepa vacinal de *B. Abortus* do tipo lisa

RB51 cepa vacinal de *B. Abortus* do tipo rugosa

BPA – teste de antígeno brucélico ácido tamponado para prova rápida em placa

D-ery - enzima da d-eritrose-1-fosfato-de-hidrogenase

ELISA – teste imuno enzimático

Er especificidade relativa

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FC teste de fixação de complemento

FIV fator de inflação da variância

FPA teste de polarização fluorescente

g gravidade

GTA guia de trânsito animal

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH Índice De Desenvolvimento Humano

IgG1 – anticorpo imunoglobulina do tipo g1

KAPPA teste de comparação de concordância entre exames

LPS lipopolissacarídeos de membranas

MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

°C – grau centígrado

OIE Organização Mundial de Saúde Animal

OPS polissacarídeo O

PCR teste de reação em cadeia da polimerase

PH potencial de hidrogênio

PIB per capita – PIB por pessoa/ano

PIB produto interno bruto

PNCEBT Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose

qPCR PCR qualitativo ou em tempo real

*Rb51* cepa vacinal de *B. Abortus do tipo rugosa*

RC – razão de chance (odd ratio)

ROC - receiver operating characteristic

SAL teste de soro aglutinação lento

SDA – secretaria de defesa animal do MAPA

Sr - sensibilidade relativa

TAL- teste do anel do leite

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

## GLOSSÁRIO

Desfecho – evento de interesse de uma pesquisa.

Distribuição normal (gaussiana) - distribuição em formato de sino de média 0 e desvio padrão 1.

Epidemiologia analítica - análise de observações usando procedimentos estatísticos e de diagnósticos adequados.

Epidemiologia descritiva - observação e registro de doenças e possíveis fatores causais.

Erro padrão da média é a raiz quadrada da variância da média da amostra  $EPM = \sigma/\sqrt{n}$

Erro tipo I: decisão incorreta de rejeitar a hipótese da nulidade quando essa hipótese é verdadeira.

Erro tipo II: decisão incorreta de não rejeitar a hipótese da nulidade quando essa hipótese é falsa.

Especificidade - proporção de verdadeiros negativos que são detectados.

Fator de risco – variável que pode estar associada a um desfecho.

Graus de liberdade - número de desvios que estão "livres" para variar, considerando que se conhece o último e que a soma dos desvios é zero.

Intervalo de confiança intervalo no qual alguém esteja razoavelmente confiante de que o verdadeiro parâmetro estará. É dado pela média amostral  $\bar{x} \pm 1,96$  erro padrão da média

Modelo estatístico é a formulação matemática da relação entre variáveis.

Nível de significância - probabilidade de cometer erro tipo I, isto é, rejeitar  $H_0$  quando  $H_0$  é verdadeira.

Observacional estudo em que o investigador apenas mensura e observa os fenômenos sem intervir no seu curso natural

Parâmetro estatístico - característica numérica de um modelo como p.ex. média, desvio padrão.

Prevalência - probabilidade de ter a doença no momento, independentemente da duração do tempo em que a doença é transmitida. Número de doentes (antigos e novos) em uma população em um determinado momento.

Prozona - efeito causado pela ausência de aglutinação em altas concentrações de anticorpos devida ao excesso de anticorpos resultando em complexos muito pequenos.

p-Valor probabilidade de se obter uma amostra tal qual a que foi obtida, quando a hipótese da nulidade é verdadeira.

Risco – probabilidade de ocorrer um desfecho em um determinado período de tempo

Sensibilidade - proporção de verdadeiros positivos detectados por um método.

Tabelas de contingência - tabelas cujas linhas representam resultados e as colunas representa os grupos . Cada uma das quatro células contem a frequência de indivíduos que apresenta o resultado e pertencem a um determinado grupo.

Teste de independência - uma das aplicações do teste do  $\chi^2$  para testar a hipótese de que duas variáveis nominais são independentes ou seja não interagem mutualmente.

Variável – observação contendo potenciais incertezas devido a variabilidade natural, erros ou vieses.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
<b>IMPORTÂNCIA</b> .....	<b>18</b>
<b>ETIOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
<b>PATOGENIA</b> .....	<b>19</b>
<b>TRANSMISSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>SINAIS CLÍNICOS NOS ANIMAIS</b> .....	<b>21</b>
<b>BRUCELOSE EM HUMANOS</b> .....	<b>22</b>
<b>DIAGNÓSTICO DIRETO</b> .....	<b>23</b>
<b>DIAGNÓSTICO INDIRETO</b> .....	<b>24</b>
<b>TESTE DE ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO</b> .....	<b>24</b>
<b>TESTE DE 2-MERCAPTO ETANOL</b> .....	<b>25</b>
<b>PROVA DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO</b> .....	<b>25</b>
<b>PROVA DE POLARIZAÇÃO DE FLORESCÊNCIA</b> .....	<b>26</b>
<b>PROVA DE ANEL DO LEITE</b> .....	<b>26</b>
<b>TESTE DE ELISA</b> .....	<b>26</b>
<b>COMPARAÇÃO DOS TESTES</b> .....	<b>27</b>
<b>CONTROLE, ERRADICAÇÃO E VIGILÂNCIA</b> .....	<b>28</b>
<b>VACINA B19</b> .....	<b>29</b>
<b>VACINA RB51</b> .....	<b>30</b>
<b>FATORES DE RISCO</b> .....	<b>30</b>
<b>ESTATÍSTICA INFERENCIAL</b> .....	<b>32</b>
<b>TESTE DO QUI-QUADRADO (<math>X^2</math>) DE PEARSON</b> .....	<b>32</b>
<b>TESTE EXATO DE FISCHER</b> .....	<b>32</b>
<b>REGRESSÃO LOGÍSTICA</b> .....	<b>33</b>
<b>DESEMPENHO DA PREDIÇÃO CURVA ROC</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>GERAL</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>37</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO</b> .....	<b>37</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA</b> .....	<b>37</b>
<b>HIPOTESES</b> .....	<b>39</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DO REBANHO E AMOSTRAGEM</b> .....	<b>40</b>
<b>TAMANHO DA AMOSTRA</b> .....	<b>41</b>
<b>COLETA DE MATERIAL</b> .....	<b>41</b>
<b>TESTES SOROLÓGICOS E LABORATÓRIO</b> .....	<b>42</b>
<b>ENTREVISTA EPIDEMIOLÓGICA</b> .....	<b>42</b>
<b>VARIÁVEIS</b> .....	<b>42</b>
<b>TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS</b> .....	<b>43</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>44</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>ANÁLISE UNI VARIADA</b> .....	<b>47</b>
<b>ANÁLISE MULTIVARIADA</b> .....	<b>49</b>
<b>QUALIDADE DO MODELO</b> .....	<b>51</b>
<b>COLINEARIDADE</b> .....	<b>52</b>
<b>ANÁLISE DA CURVA ROC</b> .....	<b>52</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>APENDICES</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma antropozoonose de distribuição mundial e de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde animal – OIE. É caracterizada por apresentar evolução crônica causando prejuízos econômicos vultosos. Nos bovinos e bubalinos, tem como agente etiológico a bactéria *Brucella. Abortus*.

Segundo Cardenas (2018) apenas 30 países são considerados livres de brucelose bovina em 156 filiados a OIE. Destes, 04 estão na África, 02 na América, n a Ásia, 04 na Oceânia e 17 na Europa. A maioria dos países endêmicos carecem de informação sobre a prevalência, distribuição geográfica e fatores de risco envolvidos na transmissão da brucelose e enfrentam problemas de saúde pública. A renda *percapita* está associada a maiores prevalências. (McDERMOTT, 2002).

O controle da brucelose é desafiador devido à complexidade dos fatores de risco ligados ao manejo do rebanho. A movimentação e o contato com outros animais em pastagens comuns ou em fontes de água constituem um risco importante para a transmissão. Além disto, outros fatores, como higiene precária da propriedade, troca de animais infectados e contato com a vida silvestre também podem contribuir. (McDERMOTT & ARIMI, 2002).

No Brasil a luta contra a brucelose é coordenada pelo Ministério de Agricultura, Pecuaria e Abastecimento- MAPA, que criou em 2001, o programa nacional de combate e erradicação de brucelose e tuberculose- PNCEBT que adota estratégia única de combate a brucelose em todo território brasileiro, exceto no Estado de Santa Catarina para se adequar aos organismos internacionais, mas, segundo Poester (2009), é flexível o bastante para se acomodar aos heterogêneos estados da federação.

Os avanços obtidos no campo do diagnósticos e das vacinas contra brucelose bovina foram significantes, porém, os impactos que a enfermidade ainda provoca na saúde pública, na produtividade pecuária e na conservação da vida selvagem torna vital a realização de pesquisas no campo de epidemiologia da doença. (PLUMB, 2013). Segundo Gaurino et. al.. (2001) o sistema de criação extensivo, as condições ambientais das propriedades e a crença equivocada de que os bubalinos são imunes a doenças que acometem bovinos dificultam o controle da brucelose em búfalos.

O ponto de partida para a análise de problemas de doenças em populações, segundo Afonso (2010), depende de uma caracterização epidemiológica bem definida da enfermidade a pesquisar-se. Mas, para Poester (2009) a situação epidemiológica da brucelose no Brasil não está adequadamente elucidada e esse conhecimento é necessário para escolha de melhores estratégias e

para o acompanhamento do programa visando possíveis correções para se evitar desperdícios de tempo e recursos.

Os prejuízos econômicos e os riscos sanitários que acarreta aos criadores e população torna urgente a busca por conhecimento sobre condições ambientais e de manejo envolvidas no processo de disseminação de doenças especialmente da brucelose em regiões de reduzido índice de desenvolvimento humano - IDH, como o Maranhão.

Esta pesquisa se propõe a utilizar um modelo matemático de regressão logística para verificar fatores que podem estar associada à ocorrência brucelose bovina em três municípios do pantanal maranhense. O modelo foi submetido ao teste da curva ROC para verificar sua acuraria na previsão de focos de brucelose em bovinos e bubalinos.

Necessidade urgente de conhecer esses possíveis fatores que podem estar associados a brucelose nos rebanhos submetidos as condições ambientais encontrados na baixada maranhense (áreas sujeitas a inundações periódicas e estiagem, hábito de mudança periódicas de pastos, baixo nível de vacinação e de realização de exames e reduzida assistência profissional veterinária) e propor medidas estratégicas mais adequadas ao combate, controle e erradicação da bacteriose na região são as justificativas para realização desta pesquisa.

Este texto está dividido em quatro partes: a primeira parte é a revisão bibliográfica que contém as principais características da brucelose, em seguida a Metodologia que descreve como a pesquisa foi delineada e realizada; na terceira parte, encontram-se os resultados e a discussão dos dados obtidos e analisados com foco nos objetivos da pesquisa e, por último, com a conclusão sobre a pesquisa.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 IMPORTÂNCIA**

A brucelose acarreta prejuízos econômicos vultosos. Sendo uma zoonose disseminada em todos mundo, mais de 500.000 novos casos de brucelose humana notificados por ano (PLUMB, 2013). Santos *et al.* (2013) estimaram os prejuízos anuais atribuídos à brucelose bovina no Brasil em 448 milhões, elevando em R\$ 155 milhões o custo da doença a cada 1% de aumento na taxa de prevalência de brucelose.

As perdas diretas provocadas pela brucelose bovina são decorrentes de abortamentos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de carne e de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas.

Estimativas mostram que a infecção é responsável pela diminuição de 20 a 25% da produção de leite, 10 a 15% da produção de carne, 15% de perda de bezerros em decorrência de abortamentos, aumento de 30% da taxa de reposição de animais e aumento do intervalo entre partos



de 11,5 para 20 meses. Mostram ainda que, a cada cinco vacas infectadas, uma aborta ou se torna permanentemente estéril (ACHA e SZYFRES, 2001).

## 2.2 ETIOLOGIA

A brucelose bovina é causada principalmente pela *Brucella abortus*, sendo o biótipo 1 o responsável por cerca de 85 % da infecção em bovinos. Menos frequentemente, a doenças tem associação com *B. militensis* e raramente com *B. Suis* (ACHA & SZYFRES, 2011)

Segundo a OIE (2018) o gênero *Brucella* pertence à família brucellacea, a ordem Rhizobiales e a classe alphaproteobacteria, e compreende 6 espécies com suas biovariedades reconhecidas: *B. Abortus* ( 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), *B. militensis* (biovares 1, 2,3), *B. suis* (bv1, 2 e 3), *B. neotomae*; *B. Ovis* e *B. Canis*.

O gênero *Brucella* tem forma de bacilos curtos que medem de 0,5 a 1,5 micrometros de comprimento por 0,5 a 0,7 micrometro de largura. Aparecem isolados, aos pares ou grupos pequenos. Bactéria imóvel, não produz esporos ou flagelos. São gran negativos corando-se de roxo por método Zeihl Neelsen. As brucelas possuem lipopolissacarídeos (LPS) em suas membranas externas com três partes: um glicofosfolipidio chamado lipídio A, um oligossacarídeo central e, na porção terminal, uma cadeia O, presente somente em brucelas lisas (CORBEL, 1997).

A cadeia O é o imunodominante da bactéria responsável pela resposta humoral nas infecções naturais ou frente a vacina B19. Esta cadeia também está relacionada com aderência da bactéria às células do hospedeiro e pode permanecer viva dentro do fagócito protegidas da ação dos anticorpos e complemento possibilitando sua viabilidade intracelular (PAULIN, 2003).

A brucela sobrevive bem em condições naturais principalmente em ambientes úmidos ou ao abrigo de luz solar direta, PH neutro ou na presença de matéria orgânica. São bastante sensíveis aos desinfetantes, a dessecação e a luz direta. Morrem com pasteurização ou fervura simples (CORREA E CORREA, 1992).

## 2.3 PATOGENIA

A principal via de entrada da bactéria em bovinos é a digestiva. A infecção pode ocorrer também, na monta natural e na inseminação artificial ou por via conjuntiva ocular e pele lesionada (ACHA & SZYFRE, 2001).

Após a infecção ocorre desenvolvimento nos tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário como baço, fígado e linfonodos. O agente etiológico tem afinidade especial com o útero gravídico, tecidos mamários e osteo- articulares e órgão reprodutor masculino. Em seguida, as bactérias migram para os linfonodos onde são fagocitadas principalmente por macrófagos, onde podem permanecer por meses. Multiplicam-se nestas células, em seguida migram para a corrente sanguínea. Após esse estagio, alojam-se nos tecidos do baço, fígado e linfonodos e

especialmente naqueles onde encontra as substâncias que estimulam a sua multiplicação: produtos de degradação do eritrol, hormônios esteroides (como a prostaglandina F2 $\alpha$ , estradiol 17 $\beta$ ) e outros progestágenos (QUINN *et al.*, 1994 *apud* PAULIN, 2008)

A disponibilidade de eritrol cresce, com a evolução da gestação até os cinco meses de prenhez. As brucelas metabolizam a eritrose, um açúcar resultante do desdobramento da eritrose, um subproduto da eritritol. A quebra da eritrose em eritrose e feita pela enzima da d-eritrose-1-fosfato-de-hidrogenase (d-ery) produzida pelas brucelas, exceto a estirpe B19 (SAMARTINO *et al.*, 1996).

A replicação, no endométrio e na placenta fetal, resulta na liberação de endotoxina e consequente lesão placentária caracterizada por placentite necrótica, responsável pela ocorrência de abortos. A lesão intrauterina progride lentamente podendo ocorrer um intervalo de meses entre a infecção e o aborto ou nascimento normal (POESTER *et al.*, 2013).

Samartine (1995) sugere que tecidos placentários gestacionais intermediários e tardios facilitam o crescimento de *B. Abortus* e podem refletir a base para a suscetibilidade in vivo frequentemente documentada da infecção gestacional tardia da placenta. Diferenças na capacidade replicativa das bactérias no tecido placentário gestacional precoce e tardio podem ser devidas às condições metabólicas alteradas do ambiente placentário, à medida que a gestação avança

A multiplicação da *B. Abortus* nos tecidos uterinos provoca uma inflamação dos placetomas que evolui para necrose, lise das vilosidades e subsequente deslocamento do cotilédone e da carúncula. Nas evoluções agudas, tem como consequência o aborto. Quando menor for a necrose maior é a deposição de fibrina entre as vilosidades e mais tardio será o abortamento. O excesso de deposição de fibrina leva a retenção de placenta. As alterações circulatórias materno fetal comprometem a respiração e alimentação do feto levando ao óbito. Fetos macerados ou mumificados são mais comuns em búfalas (ACHA & SZYFRES, 2001).

Duas semanas após a expulsão fetal quando o útero entra em diestro as brucelas migram para a glândula mamária e linfonodos supramamários. Este quadro poderá causar complicações como metrite ou endometrite crônicas com sub-infertilidade ou esterilidade, geralmente com secreção vaginal. A brucela passa a ser eliminada pelas fêmeas infectadas através dos produtos do abortamento e pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente. A eliminação do microrganismo pelo leite pode persistir durante meses (ACHA & SZYFRES, 2001).

## 2.4 TRANSMISSÃO

Segundo Acha & Szifres (2001) três elementos concorrem para difusão da brucelose bovina: (i) característica do agente (biotipo e virulência); (ii) condições do hospedeiro (estado

imunitário e reprodutivo, idade, resistência individual e sexo) e (iii) ambiente. Esses elementos se traduzem em movimentação de animais entre rebanhos infectados e livres; proximidade com rebanho infectado; presença de áreas com acúmulo de água; nível de vacinação do rebanho, tamanho (rebanhos maiores apresentam maior movimentação e maiores problemas sanitários); densidade (áreas com maior densidade apresentam maior intensidade de contatos entre os animais), prática de manejo intensivas como inseminação artificial e ausência de piquetes de parição.

A entrada do agente nas criações ocorre, principalmente, através de fêmeas infectadas com ou sem histórico anterior de abortamento (BEER, 1988). A principal fonte de infecção para bovinos, segundo Juffo (2010), é o ambiente contaminado com membranas, fluidos fetais, restos placentários e descargas vaginais eliminadas após aborto ou parto por de fêmeas infectadas. Santos *et al.* (2007) apontam os aerossóis como potencial meio de infecção

Marques e Cardoso afirmam que a higiene precária da propriedade, a troca de animais infectados e o contato com animais silvestres também podem contribuir para disseminação da bactéria. O isolamento dos animais, remoção dos produtos infectados, eliminação da matéria orgânica, desinfecção do local de abortamento, secagem de ambientes úmidos e o vazio sanitário de, no mínimo, dois meses, são práticas suficientes para evitar a transmissão da brucelose (USDA, 2006).

Existe grande variação entre os sistemas de criação de gado, desde os sistemas intensivos (confinamento total) de gado leiteiro até a pecuária extensiva de pastagem de espécies mistas com baixas concentrações de animais. O sistema de produção (intensivo e extensivo), segundo a FOA (2003) afeta a taxa de disseminação da infecção dentro e entre rebanhos.

## 2.5 SINAIS CLÍNICOS NOS ANIMAIS

A brucelose é, geralmente, assintomática em animais jovens e fêmeas não gestantes, porém em fêmeas bovinas prenhes apresentam placentites que pode causar o aborto entre o quinto e nono mês de gestação. Mesmo na ausência de aborto, líquidos fetais e secreções vaginais são intensamente contaminados pelo microrganismo. A glândula mamária e gânglios relacionados, assim como o leite podem está infectados. Os bovinos machos podem desenvolver orquites/epididimites. Causa infertilidade em ambos os sexos (OIE, 2018).

Para Bercovick (1998) quando o animal infectado aborta ou pare, a excreção de brucelas pode continuar por até 15 dias, quando as membranas fetais são totalmente expulsas. A fêmea pode tornar-se portadora e eliminar a brucela intermitentemente. Segundo Ficht (2003) isso ocorre porque o micro-organismo sobrevive nas glândulas mamárias e gânglios linfáticos dos ruminantes, realizando atividade metabólica em ambiente intracelular.

Além do abortamento no terço final da gestação podem ocorrer outros quadros clínicos como febre, anorexia, apatia, secreção vaginal, infertilidade, repetição de cios, redução na produção

de leite, mastite subclínica, elevação do número de células somáticas no leite (FIGUEREDO et al, 2015). Inflamações articulares e bursites têm baixa frequência, mesmo em rebanhos com altas prevalências da doença e são comuns a outras causas. Vários trabalhos objetivaram estabelecer relação entre bursite e detecção direta ou indireta de *Brucella* sp em bovinos com essa lesão (VIANA, 2010; SOUSA, 2016). Para McDermott (2012) artrites e higromas resultam de infecções de longa duração e podem ser um indicador útil da brucelose no rebanho.

A percentagem de aborto na primeira gestação de novilhas brucélicas não vacinadas é de aproximadamente 65 a 70%; já na segunda gestação cai para 15 a 20%; após duas gestações dificilmente acontece o aborto. (ACHA & SZYFRES, 2001). Todos os casos de aborto ou orquite em bovinos devem ser considerados suspeitos devendo ser investigados de acordo com os antecedentes do rebanho. O quadro não é patognomônico e o diagnóstico se faz por isolamento e identificação da *Brucella* ou através de teste sorológicos. Os sinais clínicos de brucelose nos búfalo doméstico (*B. bubalis*) e no búfalo africano (*Syncerus caffer*) são similares aos dos bovinos, ovinos e caprinos (OIE, 2018)

## 2.6 BRUCELOSE EM HUMANOS

### 2.7

Os maiores riscos para a transmissão da brucelose à população humana é a ingestão de leite cru e derivados contaminados, o contato direto com animais infectados, fetos e membranas fetais, sangue e outros tecidos contendo o agente. A identificação de casos de brucelose humana fornece informações epidemiológicas que justificam o desenvolvimento de um programa de controle de brucelose em animais (FRANCO, 2007).

Doença de caráter ocupacional que acomete médicos veterinários, vaqueiros, peões, magarefes, agentes de inspeção e laboratoristas, principalmente por acidentes no manuseio e aplicação da vacina viva da *B. Abortus* cepa B19 (ALMEIDA *et al.*, 2000). Realização de treinamentos contínuos, testes diagnósticos e terapêutica favorecem a resposta à brucelose e melhora o resultado do tratamento. Pode ser confundida com outras doenças infecciosas como malária e febre tifoide (SCHELLING, 2013)..

Radostits *et al.*, (2002) informam que o principal fator de risco para brucelose humana é a ocorrência primária da doença nos animais, especialmente, bovinos. A infecção está associada ao manejo de rebanhos de risco como os leiteiros e aqueles com constantes renovações do plantel. O MAPA (2004) alerta que o risco de transmissão do agente de animais para pessoas é potencializado pela inobservância de normas adequadas no manejo sanitário do rebanho.

O sintoma mais comum nas pessoas é a osteoporose, ocorrendo em 20% a 60% dos casos. A infecção por brucela no ser humano pode afetar os sistemas musculoesquelético, cardiovascular e nervoso central. Este último quadro chamado de neuro-brucelose é o mais grave da

enfermidade. Após a infecção, somente o diagnóstico precoce e a antibioterapia adequada podem prevenir sequelas graves. A mortalidade, que é baixa, resulta, geralmente, de miocardite provocada pela bactéria (PLUMB, 2013).

As perdas econômicas causadas pela doença em humanos são consequências do custo do tratamento hospitalar, do custo dos medicamentos e da perda de trabalho ou renda.

Portanto, a infecção da brucela ocorre por via oral, respiratória e conjuntival. A ingestão de produtos lácteos crus é o principal risco para a população de áreas endêmicas. Possui elevado risco ocupacional, acometendo principalmente veterinários e outros trabalhadores envolvidos com animais e seus produtos que devem sempre adotar medidas de precaução para prevenir a infecção.

## 2.8 DIAGNÓSTICO DIRETO

Nenhuma prova, isoladamente, permite identificar definitivamente a *B. Abortus* que deve se basear numa combinação de métodos sorológicos, bacteriológicos e moleculares. O isolamento da brucela é lento, caro e pouco sensível, porém deve realizar-se sempre que possível. (OMS, 1986). Para o diagnóstico da infecção por cultivo as amostras mais adequadas são secreções vaginais, fetos abortados (membranas, conteúdo gástrico, baço e pulmões), leite, sêmen, líquido sinovial (nas artrites), útero (próximo ao parto), úberes, baço e gânglios linfáticos (cervicais, mamários e genitais) (OIE, 2018)

O método de PCR incluindo o qPCR (PCR qualitativo ou em tempo real) pode detectar e identificar a brucella permitindo a diferenciação entre espécies e algumas biovariedades incluindo identificação de cepas vacinais de *B. Abortus b19*, *B. Abortus Rb51* e *Brucela militensis rev1*. (OIE, 2018)

## 2.9 DIAGNÓSTICO INDIRETO

### 2.10

Testes oficiais estabelecidos pelo programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose – PNCEBT – do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA para diagnóstico da brucelose bovina e bubalina são: antígeno acidificado tamponado - AAT, 2-mercapto-etanol –2ME, polarização fluorescente -FPA, fixação de complemento-FC e teste do anel do leite-TAL (BRASIL, 2006)

Os testes sorológicos não diferenciam as espécies de *Brucella* pois não podem identificar as espécies que induziram a produção anticorpos. Segundo Plumb (2013) somente o isolamento da *Brucella* ou detecção de seu DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), permite a identificação da cepa infectante

Segundo Paulin (2008) os critérios de escolha dos testes sorológicos de programas oficiais de combate à brucelose são: custo, praticidade de execução e situação epidemiológica da doença na região. O autor chama atenção para importância dos resultados destes testes. Um diagnóstico falso positivo significa sacrifício do animal sadio, um falso negativo, representa manutenção de fontes de infecção na propriedade.

Para Nielsen (1990) os melhores testes sorológicos para o sorodiagnóstico da brucelose baseiam-se na detecção de anticorpos anti IgG<sub>1</sub>, o mais prevalente em animais naturalmente infectados. Os testes imunes enzimáticos, ELISA indireta e ELISA competitivo, e Fixação de Complemento são os que apresentam menor limiar de detecção para esse grupo de anticorpos. O diagnóstico clínico da brucelose bovina em matadouro não é seguro pois os sinais e lesões são pouco frequentes e difíceis de detectar nos exames ante e pós-morte (VIANA, 2010; SOUSA, 2016).

## 2.11 **TESTE DE ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO**

### 2.12

O teste de Antígeno acidificado tamponado AAT funciona, segundo Wright & Nielsen (1990) devido a menor atividade da IgG<sub>1</sub> bovina em PH neutro, mudando seu comportamento bioquímico em meio ácido. Desse modo, o PH 3,65 (mais ou menos 0,5) eleva a capacidade de aglutinação da IgG<sub>1</sub>, reduz a atividade da IgM e destrói aglutininas inespecíficas.

O AAT é um teste muito sensível especialmente para a detecção de anticorpos induzidos por vacina. Podem produzir resultados falsos negativos devido ao fenômeno prozona, que pode ser contornado através de diluição do soro. É um teste sorológico rápido, barato, de simples execução e possui ótima sensibilidade e especificidade sendo classificado pela OIE (2018) como a melhor alternativa para o diagnóstico em massa.

## 2.13 **TESTE DE 2-MERCAPTO ETANOL**

### 2.14

Este teste detecta tanto IgG<sub>1</sub> quanto IgG<sub>2</sub>. O teste tem boa sensibilidade e especificidade relativa para bovinos e bubalinos (NIELSEN, 1990) e elevada concordância em relação ao FC – valores Kappa entre 91,9% e 88,5 (PAULIN, 1992). Como desvantagens do ME aponta-se o tempo de realização 48h, grandes volumes de reagentes e vidraria e toxidez de um dos reagentes.

O teste de 2ME deve ser executado segundo Bercovich (1998) juntamente com teste de soro aglutinação lenta – SAL. Isso porque não é adequado para detectar infecções agudas já que não detecta o IgM e pode apresentar resultados falsos negativos para estas imunoglobulinas. Outro motivo é fenômeno prozona o qual, segundo Nicolette (1992), pode interferir no 2ME resultando em falso negativo.

Os casos de reação falso positivo aos teste de AAT E 2ME são decorrentes principalmente de vacinação de fêmeas acima de 8 meses de idade com vacina b19 ou reações com anticorpos anti salmonela sp, escherichia coli O:157, pseudomonas sp e yersinia enterocolitica ((BRASIL, 2006).

## 2.15 PROVA DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO

2.16

É o que apresenta melhor correlação com o isolamento do agente em animais infectados segundo Nielsen (1995). O FC detecta precocemente IgG1 no soro, distinguindo-os dos casos crônicos quando os anticorpos IgG1 encontram-se em pequenas concentrações e não são detectados em testes de aglutinações. Alton (1978) afirma que o FC comparado com testes de aglutinação, sofre menos influência dos anticorpos vacinais sobretudo após o oitavo mês pós vacinal.

O teste de FC tem como desvantagem a necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal técnico especializado. Apresenta alta especificidade, porém, menor sensibilidade que o AAT e ELISA. Podem apresentar, raramente, resultados falsos positivos quando a predominância de anticorpo IgG2 impede a ligação do IgG1 ao antígeno (OIE, 2018).

As possíveis causas deste fenômeno são: idade avançada do animal, sucessivas exposições ao agente, estresse e transferência ativa pelo colostro. Neste caso, o anticorpo IgG não fixa o complemento, mas reagem com o antígeno gerando resultado semelhante ao fenômeno prozona (BRANDAN *et al.* 1971 *apud* PAULIN, 2008).

O FC é teste de referência pelo código zoossanitária internacional para o comércio internacional animais (OIE, 2006).

## 2.17 PROVA DE POLARIZAÇÃO DE FLORESCÊNCIA

2.18

Este teste foi desenvolvido para diagnóstico da brucelose em diversas espécies e se baseia em diferenças rotacionais antes o antígeno solúvel LPS e o complemento antígeno anticorpo. É utilizado como antígeno um fragmento de baixo peso molecular do OPS do sLPS da cepa 1119-3 de B. Abortus marcado com isotiocianato de fluoresceína (SAMARTINO *et al.*, 1999).

É uma prova sorológica muito sensível. A técnica permite reduzir as reações contra anticorpos residuais de vacinação. As vantagens do método são realização em dois minutos, não requer lavagens para remoção de reagentes e, sendo realizado por aparelho portátil, pode ser executado em laboratório simples. O teste é barato, necessita de pequeno volume de soro e não é afetado pela hemólise (NIELSON, 1996).

## 2.19 PROVA DE ANEL DO LEITE

Prova usada em leite colhido em tanque de triagem em rebanhos pequenos. Quando ha mais de 100 animais lactentes deve ser ajustada para compensar a diluição de leite de tanque. Pode apresentar resultados falsos positivos em animais que foram vacinados até 4 meses antes do exame, em leite com presença colostro ou em casos de mamites.

## 2.20 TESTE DE ELISA

### 2.21

Método de diagnóstico indireto da brucelose indicado pela OIE com utilização de diferentes preparações antigênicas, kits de antiglobulinas com variados substratos e cromogênicos. O i-Elisa é muito sensível para detecção de anticorpos anti-brucela em bovinos mas não resolve o problema da interferência de anticorpos de origem vacinal b19 da *B. Abortus*. Alguns protocolos comercializados apresentam variações de sensibilidade e especificidade, portanto nem sempre se pode comparar os resultados. O c-ELISA é um teste imune enzimático utilizado no diagnóstico da brucelose que tem apresentado melhor resultado com elevada sensibilidade e especificidade relativa. Não apresenta efeito prozona como no FC podendo ser automatizado (NIELSEN, 1995)

## 2.22 COMPARAÇÃO DOS TESTES

### 2.23

O coeficiente de KAPPA de Cohen é a medida mais comum de comparação de valores da variável categórica quando tais valores são obtidos a partir de dois métodos de mensurações (PETRIE & WATSON, 2009). Segundo Nielsen (1995) a reação de fixação de complemento (FC) é a melhor prova de sorodiagnóstico para a confirmação da brucelose, apresentando a melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados.

Para comparar diferentes teste para diagnóstico de brucelose em fêmeas bubalinas, Molnar *et al.* (2002) examinaram 440 animais sem histórico de vacinação e encontraram os seguintes resultados: sensibilidade relativa de AAT, SRP, i-ELISA e c-ELISA foram respectivamente 93%, 79,3%, 98,6% e 97,1 e os valores Kappa foram 0,99, 0,54, 0,93 e 0,91, respectivamente.

Pinto *et al.* (2005) testaram 90 fêmeas bubalinas não vacinadas de propriedades infectadas com *B. Abortus* para comparação dos testes AAT, ME e FC e constaram uma sensibilidade relativa de 93% e valor Kappa de 0,93% para AAT em relação aos outros exames.

Paulin (2006) examinou 696 fêmeas bubalinas oriundas de propriedades com histórico de falhas reprodutivas e concluiu que as melhores combinações de sensibilidade relativa  $S_r$  e Especificidade relativas  $E_r$  foram alcançadas pelo c-ELISA, PF, BPA e AAT; os melhores valores de Kappa foram alcançados pelo c-ELISA(0,93), PF (0,84), BPA(0,82) e AAT(0,7); os melhores testes



de triagem em bubalinos foram BPA e AAT; e os melhores testes confirmatórios foram o c-ELISA e BPA.

Este último autor relata que houve baixa sensibilidade relativa do i-ELISA resultado que atribui ao uso de anticorpos policromais anti-bovina. Explica que estes anticorpos IgG1 apresentam algumas variações em relação aos anticorpos IgG1 da espécie bubalina. Guarino (2001) utilizando conjugados anti-IgG1 bubalino encontrou valores de Sr e Er de 100% e 98,6%

Paulin & Ferreira Neto (2008) afirmam que pesquisas envolvendo métodos diagnósticos em brucelose estão mais voltadas para a espécie bovina, em detrimento da bubalina e isso se deve ao paradigma de que resultados em bovinos pode ser inferidos a ambas. O autor chama atenção para a necessidade de trabalhos voltados, especificamente, para búfalos.

## 2.24 **CONTROLE, ERRADICAÇÃO E VIGILÂNCIA**

### 2.25

Para McDermott (2013) erradicação da brucelose compreende adoção de medidas como capacidade de rastrear, testar, identificar, isolar e remover animais e rebanhos infectados com compensação dos produtores pelos animais eliminados e aplicação rigorosa das restrições de movimentação e comércio.

Vacinação em massa é a base do controle da brucelose na pecuária, mas deve ser combinada com outras medidas que limitem a disseminação do patógeno, permitam a identificação de animais e rebanhos e aumentem a participação da comunidade. O objetivo da vacinação é alcançar um alto nível de proteção para todos os animais adultos e jovens em um curto período de tempo. Em taxas de prevalência mais baixas, ou quando uma parcela significativa da população de animais foi vacinada e protegida, a introdução do teste e do abate é recomendada (SMITH, 2013).

O controle da brucelose tem sido alicerçado em diagnóstico e estimativa de prevalência associado a um sistema de vigilância. As medidas de controle são conduzidas para reduzir prevalência inicial, seguida McDermott (2012) recomenda quarentena e abate sanitário com indenização. Mas alerta que os estágios finais da erradicação da brucelose, são difíceis quando as taxas estão baixas e o custo de encontrar os animais positivos tornam-se elevados. Existência de reservatórios de fauna silvestre também constituem complicações aos programas de erradicação de brucelose

O controle e a erradicação da doença provavelmente não são viáveis em países com recursos veterinários inadequados, incapacidade de controlar o movimento dos animais, alta prevalência em animais selvagens e ausência de comprometimento de produtores rurais. Além disso, o controle ao longo prazo sem erradicação é muito difícil de manter. O desafio é planejar e avaliar os esforços de controle que possam ser viáveis e economicamente benéficos (McDERMOTT, 2012).

O abate sanitário ou eutanásia dos bovídeos, no Brasil, acometidos de brucelose é obrigatório sem indenização do produtor, que também deverá arcar com despesas administrativas, conforme Decreto nº 24.548 de 3 de julho de 1934 (Brasil, 1934). A Instrução Normativa SDA nº 10, de 03 -03-2017 que modificou o PNCEBT, porém, libera ao consumo as carcaças de animais positivos para brucelose desde que não haja lesões indicativas da doença ou estado febril no exame ante morte e que sejam abatidos em estabelecimento com serviço de inspeção oficial.

Um alto grau de participação popular é um fator importante para o sucesso no controle da brucelose bovina. A transmissão de informações sobre a brucelose e a educação do público aumenta a participação da comunidade e promove a aceitação de medidas preventivas e de controle. (SMITS, 2013). Agricultores que não sabem que a brucelose é uma doença infecciosa e que não entendem as consequências da infecção, podem não saber como a enfermidade pode ser evitada e não aceitar de bom grado as medidas de controle.

Smits (2013) recomenda que as informações sejam transmitidas de forma simples em reuniões planejadas para ajudar a população a entender, aceitar e seguir medidas preventivas. O autor acrescenta que a educação é crucial para desconstruir práticas e crenças tradicionais que colidem com as estratégias de intervenção e eleva os níveis de compreensão, cooperação e adesão aos programas de saúde pública. Um sistema de vigilância adequado e em bom funcionamento é ferramenta importante no controle da brucelose e necessário para determinar as medidas de controle, monitoramento do progresso e garantia da eficácia da vacinação .

Portanto, medidas cruciais para um programa de controle são: a localização de animais seropositivos, rastreamento de animais transportados ou vendidos ilegalmente, controle da qualidade de vacinas, cobertura vacinal e o uso de norma padronizada.

### 2.25.1 VACINA B19

Para prevenção de brucelose em bovinos e bubalinos a vacina de referência da OIE é aquela preparada com cepa b19 de *B. Abortus*. Trata-se de uma vacina viva administrada em bezerras de 3 a 8 meses de idade em uma única dose subcutânea contendo 5 a 8 x10<sup>10</sup> microrganismos viáveis. A vacina B19 de *B. Abortus* confere uma boa imunidade diante da exposição a *B. Abortus* ou *brucella militensis* virulentas (OIE, 2018).

Esta vacina tem sido usada, juntamente, com provas sorológicas e sacrifício para erradicar a brucelose em muitos países. Pode causar provocar infecção no trato genital do macho por isso é contra indicada para esses animais, sendo segura em bezerras de 3 a 6 meses, produzindo imunidade duradoura (OIE, 2018)

Nesse ponto, Smith (2013) aponta algumas limitações das vacinas como: interferência com sorologia, efeito abortivo quando usado durante a gravidez, virulência para humanos com risco

de infecção pelo leite não pasteurizado. Além disso, essas vacinas são termicamente instáveis e, portanto, requerem precauções específicas de logística, armazenamento e controle de qualidade quando usadas em áreas remotas (.).

Segundo Corbel (1997) a atenuação e a baixa patogenicidade devem-se a perda de 72 pares de base eritrose-1-fosfato de hidrogenase-ERY durante a mutação espontânea da estirpe B19 e por isso, não há produção de enzima D-Ery, inibindo sua multiplicação além da acumulação de produto tóxico intermediário D-reitrose-1-fosfato. Segundo Paulin & Ferreira Neto (2008) a vacina com cepa B19 protege contra a infecção e o abortamento em cerca de 60 a 75% conforme a prevalência da brucelose no rebanho.

### 2.25.2 VACINA *RB51*

A *Rb51* é um vacina desenvolvida para bovinos contendo uma mutante rugosa com características semelhantes a B19. Porém, por não possuir a cadeia O não induz a formação de anticorpos detectáveis pelos testes de sorológicos da *B. Abortus* e tem baixa virulência. Apresenta as mesmas propriedades da cepa bv 1 de *B. Abortus* porém apresenta-se totalmente em fase rugosa e cresce em presença de ranfipicina a 250 ug/ml. A cepa rb51 da *B. Abortus* contém um OPS que em animais vacinados não apresentam seroconversão nos testes de rosa bengala ou fixação de complemento (USDA, 2006).

Paulin, Ferreira Neto (2008) sugerem a utilização da *Rb51* em fêmeas adultas não reatoras visando aumento de cobertura vacinal em situação de altos riscos de infecção, em fêmeas não vacinadas com B19 devida a idade avançada e a falhas na vacinação.

Muitos países utilizam esta vacina desde 1996 em seus programas oficiais de prevenção de brucelose bovina. Porém, segundo a OIE (2018), a eficácia da cepa *Rb51* em comparação com a proteção induzida pela *S19* em bovinos é controversa. Administrada por via endovenosa, pode provocar infecções placentárias graves na maioria do rebanho e excreção no leite de animais vacinados, além de induzir abortos e mortalidade perinatal se administrado em fêmeas gestantes. Protege contra desafio moderado contra *B. Abortus* virulenta. A duração da proteção é ainda desconhecida.

A brucelose constitui-se em uma das infecções mais fáceis de contrair em laboratório, por isso, o cultivo celular deve ser realizado em condições ideais de biossegurança. Portanto, sendo a vacina, considerada um patógeno para os responsáveis pela administração a campo, sua reconstituição e manipulação devem ser realizadas com cuidado para evitar injeção acidental ou contaminação da pele ou mucosa. A eficácia de antibioticoterapia, em humanos, contra b19, *Rb51* rev1 se desconhece. (OIE, 2018). Não há vacinas desenvolvidas para seres humanos.

### 2.25.3 FATORES DE RISCO

A expressão fator de risco é geralmente usada para descrever fatores que estão associados ao risco de desenvolvimento de uma doença, mas não são suficientes para causá-la. A análise de fatores de risco pode revelar tanto a contribuição relativa de cada fator para a ocorrência da doença, como também, o potencial de redução na incidência da doença. Alguns fatores estão associados com inúmeras doenças e algumas doenças estão associadas com vários fatores de risco.

Os principais fatores de risco mencionados na literatura estão relacionados a entrada de animais na propriedade por migração ou comércio. Outros fatores citados são baixa taxa de vacinação, alta densidade nos rebanhos, demora na identificação e eliminação dos animais infectados, ocorrência de abortamentos, inseminação artificial, presença de outras espécies na propriedade, acesso a áreas alagadas, tipo de exploração etc, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 Alguns fatores associados a brucelose bovina, no Brasil, no período de 2001 a 2019

Fator de risco	Razão de Chances	Local	Referência
Aquisição	5,25	PB	De Oliveira et al, 2013
	1,94	MA	Prazeres, 2014
	1,56	SP	Dias et al., 2001
Tamanho de rebanho	2,65	PE	Almeida, 2016
	7,82	MG	Oliveira, 2016
	2,25	SP	Dias et al., 2001
	4,08	MA	Borba, 2012
	1,87	RR	Souza, 2012
Aborto	9,06	MA	Santana, 2012
	11,36	MA	Sousa, 2019
Aluguel de pasto	2,2	RR	Souza, 2012
	1,83	MA	Borba, 2012
Confinamento	2,98	ES	Azevedo, 2006
Consumo de lácteos por outros animais	4,32	MA	Alencar, 2016
Pastos alagados	1,66	MA	Borba, 2012
	2,86	PE	Almeida, 2016

Trânsito	9,5	MA	Prazeres, 2014
Inseminação artificial	7,05	ES	Azevedo, 2006
Pastagens comuns	17,33	MA	Prazeres, 2014
Idade 64 meses	5,47	MA	Prazeres, 2014
Resíduos de aborto	5,4	MA	Prazeres, 2014
Presença de ovinos	6,66	MA	Carvalho, 2016
Finalidade leite	2,04	PA	Batista, 2019

## 2.26 ESTATÍSTICA INFERENCIAL

### 2.26.1 TESTE DO QUI-QUADRADO ( $\chi^2$ ) DE PEARSON

Serve para testar hipóteses de associação entre duas variáveis nominais em tabela de contingência conhecido como teste de independência. O valor do  $\chi^2$  é dado pela seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Onde  $O_i$  ( $i=1 \dots r$ ) são as frequências observadas e  $E_i$  são as frequências esperadas;  $r$  são as categorias da variável em análise.

O valor calculado de qui-quadrado é comparado com o valor tabelado ao nível de significância estabelecido com  $(r - 1) \cdot (i-1)$  graus de liberdade. Quando o valor calculado da estatística for menor do que o valor crítico da tabela, não se rejeite a hipótese da nulidade ( $H_0$ ) ao nível estabelecido de significância, caso contrário, rejeita-se a hipótese da nulidade ( $H_0$ ) em favor da alternativa ( $H_1$ ).

### 2.26.2 TESTE EXATO DE FISCHER

É uma distribuição hipergeométrica que se baseia em cálculo de probabilidade exata para as tabelas 2x2 possíveis com os mesmos totais marginais que a tabela observada. Pode ser usado em substituição ao teste de  $\chi^2$  quando for inadequado considerando dados obtidos (tamanho da amostra, frequência de casos etc). É calculado pela seguinte fórmula:

Variável X	Variável Y		Total
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	
X1	a	b	a+b
X2	c	d	c+d

total	a+c	b+d	n
-------	-----	-----	---

$$P_a = P[X = a] = \frac{\binom{a+b}{a} \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!n!}$$

Para a hipótese

alternativa, o p-valor é interpretado como a probabilidade de obter uma tabela tão extrema quanto ou mais extrema que a tabela de frequências observadas.

### 2.26.3 REGRESSÃO LOGÍSTICA

É utilizada em estudos epidemiológicos com variáveis nominais quando se quer modelar relação entre uma ou mais variáveis preditivas e uma variável dependente. É o método de escolha para analisar resultados binários servindo também para prever resultado de interesse (PETRIE & WATSON, 2009)

A regressão logística deriva de regressão linear múltipla dado pelo modelo  $p = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k$  onde  $p$  = probabilidade de doença. Realiza-se transformação logística (de  $p$  para variável dependente) chamada logit ( $p$ ) =  $\ln[p/(1-p)]$  para corrigir o problema da impossibilidade de se obter probabilidades previstas menores que 0 ou maiores que 1. O logit é o logaritmo natural de uma razão de chances -RC.

Quando o logit ( $p$ ) for modelado como uma função linear das variáveis independentes  $x_1, \dots, x_k$ , obtêm-se o seguinte modelo de regressão logística.

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k$$

Neste modelo, o  $p$  está sempre entre 0 e 1, independentemente dos valores de  $x_1, \dots, x_k$ . De acordo com Demaris (1995) a função logística é uma curva em forma de S ou sigmoide: aproximadamente linear no meio e curvada nas extremidades, quando  $x$  se aproxima de valores muito pequenos ou muito grandes.

Para interpretar os parâmetros da regressão a variável de exposição dicotômica ( $x_j$ ), que foi codificada como 1 se presente e 0 se ausente. Para o modelo de regressão logística a razão de chances (RC) relaciona essa variável de exposição à variável dependente (saída) é estimado por  $RC = e^{\beta_j}$ . Essa relação expressa as probabilidades a favor do sucesso se  $x_j = 1$  dividido pelas probabilidades a favor do sucesso se  $x_j = 0$ , após controlar todas as outras variáveis no modelo.

Dessa forma, se  $\beta_j$  representa o coeficiente de regressão para a variável  $x_j$ , a exponenciação de  $\beta_j$  produz a razão de chances que significa a mudança nas chances de  $Y$ , dada uma mudança unitária em  $x_j$ , quando todos os outros preditores são mantidos constantes. Bonita (2010) explica que o modelo de regressão é baseado na variável dependente  $y = \ln(RC)$

representando o logaritmo natural na base “e” (2.7182818...). RC é a probabilidade p de um evento ocorrer dividida pela probabilidade de ele não ocorrer:  $RC = p/(1-p)$ .

Objetivo, portanto, de uma Regressão Logística é obter um modelo matemático que possa prever com certo nível de confiança, a partir de um conjunto de características, condições ou fatores, um determinado desfecho ou resposta. A regressão logística, portanto, considera a influência conjunta das variáveis independentes sobre a variável resposta, de modo que cada variável inserida pode potencializar ou reduzir o efeito das outras.

A RC é igual à base natural do logaritmo (e) elevada ao expoente de inclinação  $\beta$  ( $e^\beta$ ). A interpretação dos resultados é feita usando a RC de acordo com os seguintes critérios: associação positiva quando  $RC > 1$  (fator de risco); inexistente, quando  $RC = 1$  e, negativa quando  $RC < 1$  (fator de proteção).

As variáveis explicativas possuem coeficientes na equação logística que são testados para avaliar se cada uma dessas variáveis contribui significativamente para um efeito, após o ajuste dos possíveis efeitos de confusão de outras variáveis. Nestes termos, Petrie & Watson (2009) explicam que o exponencial de cada coeficiente logístico é a proporção de probabilidade de um resultado determinado para o aumento de uma unidade na variável preditora (independente)

Para uma correta interpretação da RC é necessário, segundo Peng (2002), que três condições sejam atendidas: (a) a variável  $x_j$  não deve interagir com outra variável; (b) a variável  $x_j$  deve ser representado por um único termo no modelo; e (c) uma alteração de uma unidade na variável  $x_j$  deve ser significativa e relevante. Em outras palavras as variáveis preditivas devem ser independentes e sem elevada correlação entre si.

Nesse contexto, Demaris (1995) alerta que a multicolinearidade entre as variáveis explicativas é um problema na regressão logística e recomenda realizar-se teste diagnóstico nos casos suspeitos e substituição por outro preditor igualmente importante sem colinearidade forte. Fiel (2011) classifica uma correlação como elevada quando apresenta valor acima de 0,80 e aponta o Fator de Inflação da Variância (FIV) como método de diagnósticos de colinearidade: valores de FIV acima de 10 indicam correlação alta entre as variáveis.

O método é utilizado para estimar os parâmetros ( $\alpha$  e  $\beta$ s) do modelo de regressão logística é o da máxima verossimilhança, uma técnica destinada a maximizar a probabilidade de prever os dados, com base em estimativas (Hosmer e Lemeshow, 1989). Porém, é inadequado nos casos em que a variável dependente é rara ou a amostra é pequena, segundo Coster (2012), por apresentar resultados viciados.

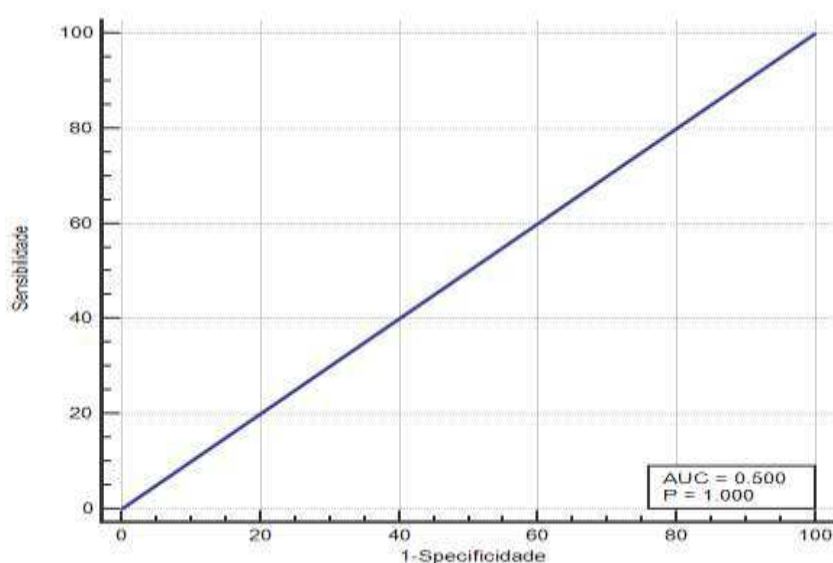
Outro método de avaliação do desempenho do modelo da regressão logística foi proposto por Hosmer e Lemeshow (2000) utilizando uma técnica chamada curva ROC (receiver operating characteristic). Esta verifica a capacidade do modelo de regressão logística em prever corretamente resultados negativos e positivos.

## 2.26.4 DESEMPENHO DA PREDIÇÃO CURVA ROC

Após o ajuste de um modelo e a determinação do ponto de corte, é importante avaliar o seu poder de discriminação. A curva ROC é um teste representado por um gráfico que mostra no eixo das ordenadas (eixo y) os verdadeiros positivos (sensibilidade) e, no eixo da abscissa (eixo x), os falsos positivos (1-especificidade).

A área sob a curva ROC (AUC) mede o poder discriminatório de um teste diagnóstico e varia de 0,5 a 1,0. Um valor de AUC de 0,5 indica ausência de poder ou contribuição do método (isto é, 50% sensível e 50% específico) e é representado por uma linha reta em diagonal que se estende do canto inferior esquerdo ao canto superior direito, sendo uma diagonal que divide a área pela metade. O valor 1,0 indica um teste (teoricamente) perfeito (ou seja, 100% sensível e 100% específico) e corresponde a toda a área da curva.

Figura 1 exemplo de curva ROC mostrando área sob a curva igual a 0,5



S

segundo

Ladeira-Fernandez (2012) o ponto de corte ideal é aquele que busca o equilíbrio entre sensibilidade e especificidade de um procedimento diagnóstico. Quanto mais próximo do ápice da curva em direção ao canto superior esquerdo, maior a capacidade discriminatória do teste (ou seja, a taxa de verdadeiro positivo é alta e a de falso positivo [1 - Especificidade] é baixa). O pesquisador pode optar por uma sensibilidade mais alta em detrimento da especificidade, mas é preciso considerar o risco de classificar o indivíduo como evento sendo ele não evento (falso positivo) e classificar o indivíduo como não evento sendo ele evento (falso negativo) traz prejuízos equivalentes: abate ou eutanásia de um animal sadio ou manutenção de um animal doente na propriedade.



Segundo Borba (2012) a curva ROC pode ser empregada em estudos transversais na avaliação de modelo de regressão logística. Neste caso, as proporções de variáveis-respostas correta e incorretamente previstas no modelo são a sensibilidade e (1 – especificidade).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Verificar existência de associação entre fatores de risco e a infecção por *B. Abortus* em bovinos e bubalinos submetidos a sistema de criação extensiva na área de estudo e contribuir para redução da incidência e prevalência da doença na região.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a prevalência de infecção por *B. Abortus* na população estudada.
- ⑩ Utilizar um modelo regressão logística na análise de fatores de risco para brucelose bovina
- ⑩ Testar a qualidade do modelo utilizando curva ROC.
- ⑩ Compartilhar resultados com órgãos de defesa e comunidade
- ⑩ Propor aperfeiçoamento nas estratégias de combate a brucelose bovina.
- ⑩ Colaborar para o PNCEBT orientando produtores rurais sobre a doença

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO**

Trata-se de estudo epidemiológico analítico do tipo observacional transversal que se propõe a analisar fatores ambientais e manejo associados à brucelose bovina. Os trabalhos de campo foram realizados no período de novembro 2019 a junho de 2020. Os dados de propriedade e produtores foram fornecidas pela Agencia de Defesa Agropecuária do Maranhão AGED. O editor de texto utilizado foi o LibreOffice Writer e no método de amostragem usou-se LibreOffice Calc versão 6.2 ambos os softwares livres.

#### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA**

O Maranhão localiza-se na região nordeste do país, limitando-se ao norte com o oceano atlântico, ao leste com o estado do Piauí, ao sudoeste com o Tocantins e a oeste com o estado do Pará. Possui uma área de 331.935,507 quilômetros quadrados e uma população estimada em 2018 de 7.035.055 de pessoas segundo Instituto brasileiro de Geografia e estatística – IBGE.

O estado possuía, em 2017, um PIB de R\$ 89,5 bilhões com renda per capita de R\$ 636,00 e índice de desenvolvimento humano (IDH) de 0,687 ocupa as últimas posições (26<sup>a</sup> e 27<sup>a</sup>) entre as 27 unidades da República Federativa do Brasil.

A Baixada Maranhense localiza-se na mesorregião Norte, entre as coordenadas 1° 00' – 4°00'S e 44° 21' 45"21W, com uma área total de 17.579,366 km<sup>2</sup>, abrangendo 21 municípios, estende-se por 20.000 km<sup>2</sup>. É banhada pelos rios Mearim, Pindaré e Pericumã. Sua vegetação é rica e variada com manguezais, campos aluviais eflúvios marinhos, lagos, florestas de galeria e babaçuais. Possui tesos pouco atingidas pelas enchentes. Na estação chuvosa, quando os rios e lagos transbordam, os campos são inundados e transformados em extensos lagos rasos. (MUNIZ, 2007).

Os municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia estão localizados na Baixada Maranhense ocupando uma área de 5.214 km<sup>2</sup> e com uma população 151.136 habitantes de acordo com o IBGE.

Figura 3 Mapa do Maranhão com destaque para os municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia.



wikipedia.

Adaptado.

Fonte:

Tabela 3 Dados censitários dos Municípios Pinheiro, Santa Helena e Turilândia

Municípios	Area (km <sup>2</sup> )	População (2019)*	PIB per capita anual (R\$)	IDH**
Pinheiro	1.513	83.387	10.081	0,637
Santa Helena	2.189	42.130	6.678	0,571

Turilândia	1.512	25.619	6.150	0,536
------------	-------	--------	-------	-------

Fonte IBGE, 2020 \* população estimada para 2019 - \*\* IDH correspondente a 2010.

### 4.3 HIPOTHESES

As hipóteses nula e alternativa consideradas neste trabalhos foram: H0: não existe associação entre a variável dependente ( resposta) e as variáveis independentes (provisoras), correspondentes aos fatores de exposição, isto é, a equação de regressão não explica a variação na variável resposta.

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$$

$$H_1: \text{pelo menos um } \beta_j \neq 0$$

Figura 4 Regiões de aceitação e rejeição para o teste do qui-quadrado.

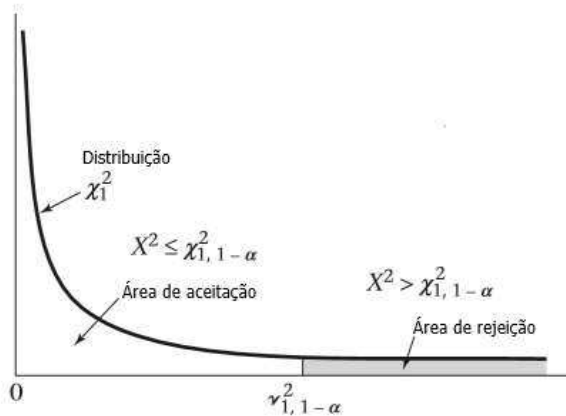
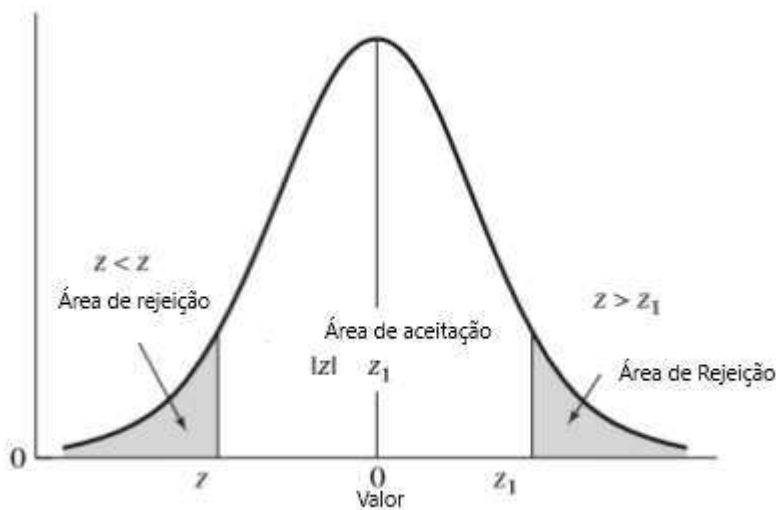


Figura 5 Regiões de aceitação e rejeição para o teste da hipótese



H0:  $\beta_j = 0$ , todos os outros  $\beta_l \neq 0$ , vs. H1: todos  $\beta_j \neq 0$  em regressão logística

Assim, na hipótese nula a j-ésima variável independente não apresenta associação com a variável dependente após controle das outras variáveis, portanto, rejeita-se a hipótese nula quando pelo menos um  $\beta$  é diferente de zero na população, ao nível de significância de 5 %. Considerou-se significativa a associação entre cada  $x_j$  (j-ésima variável independente) e a variável dependente ( $Y_j$ ) quando o valor do intervalo de confiança da Razão de Chances não incluiu o valor 1.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO REBANHO E AMOSTRAGEM

A população estudada construiu-se de fêmeas bovinas e bubalinas com idade superior a 24 meses, provenientes de propriedades localizadas na área de abrangência da pesquisa, sem sinais de parto recente, gestação avançada ou lesões sugestivos de brucelose. Desconsiderou-se as características raciais. Os machos foram excluídos para uniformização dos grupos.

A população foi dividida em dois grupos exclusivos: O grupo 01 (G1) foi constituído de animais cujas as coletas foram realizadas nas propriedades rurais. A escolha dos animais dentro de cada propriedade foi casual sistemática. As propriedades que possuíam bovinos e bubalinos foram coletadas amostra de ambas e naquelas onde, por qualquer motivo, a coleta não foi possível, foram substituídas por outras com as mesmas características e localizadas nas proximidades. Para manter a representatividade de cada município considerou-se o número de propriedades cadastradas no órgão de defesa agropecuário.

O grupo 02 (G2) foi formado de animais levados ao abate cujas as coletas foram realizadas nos abatedouros de Santa Helena (público) e de Pinheiro (privado) com frequência média de abate de 17 e 40 cabeças/dia, 3 e 4 dias por semana, respectivamente, ambos sem serviço de inspeção sanitária. A amostragem neste grupo foi do tipo não probabilística por conveniência. Após seleção, as propriedades de origem dos animais, foram localizadas a partir das guias de transito animal GTA prestadas pelos proprietários.

#### 4.4.1 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho mínimo da amostra foi calculada segundo WHO (1991) e Fontelles (2010) pela fórmula:

$$n = (p1.q1+p2.q2). (Z\alpha/2 + Z\beta)^2 / (p1-p2)^2$$

Onde n é o número de animais;  $\alpha = 0,05$  é o erro tipo I (1,96);  $\beta = 20$  é o erro tipo II, para poder do teste  $(1 - \beta)$  de 80% (0,84). Z obtido da tabela de distribuição normal para o nível de confiança de 95% . p1 e p2 são as prevalências brucelose na baixada maranhense segundo Chaves *et al.* (2012) 5 % e prevalência esperada para os animais expostos, 10%, respectivamente. Assim o tamanho amostral calculado foi 432, porém foi possível coletar 491 amostras.

$$n = (0,05 \times 0,95 + 0,10 \times 0,90) \times (1,96 \times 0,84)^2 / (0,05 - 0,10)^2$$

O número de amostras em cada propriedade foi calculado segundo Borba (2012) considerando especificidade do teste em 99,5 e sensibilidade em 95% e prevalência estimada para o rebanho de 20%. Dessa forma rebanhos com 1 a 10 fêmeas maiores de 24 meses, coletou-se todas; rebanhos com 11 a 99, coletou-se 10 amostras e rebanhos com mais de 99 fêmeas, 15 amostras.

#### 4.4.2 COLETA DE MATERIAL

Após a definição das propriedades entre aquelas que atendiam aos critérios de seleção, realizou-se uma primeira visita para obtenção de consentimento do produtor e agendamento de data e horário da coleta. Sempre que possível as coletas foram realizadas em horários de temperaturas amenas de modo a evitar estresse aos animais.

No G1 as amostras foram obtidas por punção das veias jugular ou caudal, com auxílio de seringas de 10 ml e agulhas descartáveis calibre 40X12 mm, depois de adequada contenção dos animais. No G2 as coletas foram colhidos no momento da sangria diretamente dos vasos seccionados. O material era, em seguida, transferido para tubos plásticos identificados com nome do animal e número da propriedade. Depois, acomodados inclinadamente para favorecer a retração do coágulo e consequente decantação, a temperatura ambiente e transportados ao laboratório. Em seguida, centrifugadas, por 15 minutos, a 2000G para obtenção dos soros os quais foram armazenados em micro tubos a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  (vinte graus negativos) até a realização dos testes.

#### 4.4.3 TESTES SOROLÓGICOS E LABORATÓRIO

Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Curso de Medicina Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). O

diagnóstico laboratorial seguira os testes e critérios estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), pelo método de antígeno acidificado tamponado AAT

Não foram realizados os testes 2–Mercaptoetanol (2-ME) associado ao teste de soro aglutinação lento (SAL) por faltar no mercado o material de exame.

#### **4.4.4 ENTREVISTA EPIDEMIOLÓGICA**

As entrevistas com proprietários ou responsáveis pelos animais foram feitas após a realização das coletas. Nos casos em que a coleta foi realizada nos abatedouros a identificação dos proprietários foi realizada a partir das guias de trânsito animal (GTA) ou registro fornecidos pelos estabelecimentos. Utilizou-se formulário epidemiológico estruturado com perguntas do tipo semiaberta sobre práticas de manejo e condições ambientais referentes aos últimos 12 meses e observação direta (Apêndice I.). O critério de escolha das variáveis teve como referência a bibliografia consultada.

#### **4.4.5 VARIÁVEIS**

Para análise estatística dos dados as variáveis foram codificadas com 00 para ausência de evento e 01 para presença. A variável dependente ou de saída corresponde ao resultado do teste sorológico e as variáveis independentes ou previsoras correspondem aos seguintes fatores de risco.:

- Aquisição de bovídeos nos últimos 12 meses
- Compartilhamento de touros
- Movimentação entre propriedade (saída com retorno)
- Aluguel de pastos de /para terceiros
- Acesso a campos comuns
- Acesso às áreas alagadas
- Contato com animais do vizinho
- Contato com outras espécies de mamíferos
- Fornecimento de ração ou sal
- Recolhimento diário do rebanho (pernoite agrupado)
- Abate na propriedade
- Vacinação brucelose
- Realização de exames periódicos de brucelose
- Ocorrência de aborto
- Tratamento de placenta e restos fetais

- Histórico de brucelose na propriedade
- Tamanho do rebanho

A variável numérica indicativa da quantidade de animais nos rebanhos foi categorizada (criação de variáveis dummy), transformando-a em uma variável nominal dicotômica. Receberam código 00 as propriedades com menos 60 cabeças e as demais receberam código 1,0. Este ponto de corte foi obtido a partir da mediana acrescentando-se ou reduzindo valores até obter-se maior  $\chi^2$ . Considerou-se a totalidade dos bovídeos existentes na propriedade, mesmo que de mais de um criador. Não houve casos de conflito de autorização para realização das coletas, nesses casos

#### 4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A verificação da hipótese nula foi realizada em duas etapas. Inicialmente uma análise univariada, na qual cada variável provisoras foi cruzada com a variável dependente, com utilização do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou exato de Fischer (quando mais adequado) ao com nível de significância de 20%. ( $\alpha = 0,2$ ) com  $(r - 1) \cdot (i - 1)$  graus de liberdade. Em seguida, procedeu-se análise multivariada, utilizando-se um modelo de regressão logística. Nesta etapa, somente as variáveis selecionadas na análise univariada foram incluídas.

O Fator de Inflação da Variância (FIV) foi utilizado como método de diagnósticos de colinearidade entre as variáveis independentes. Nos casos de multicolinearidade optou-se por excluir-se as variáveis com menores contribuições ao modelo.

O exame da área sob curva ROC foi utilizado para verificar, quantitativamente, a acurácia do modelo final de regressão logística na previsão de casos de brucelose bovina na população em estudo.

#### 4.6 ASPECTOS ÉTICOS

4.7

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual do Maranhão (CEP/UEMA) em atendimento as exigências da Resolução nº. 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. Aos participantes da pesquisa foi apresentado e solicitado assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) conforme modelo apêndice .

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o diagnóstico sorológico de brucelose foi realizado o teste antígeno acidificado tamponado adotando-se critérios da leitura preconizados pelo PNCEBT. Considera-se que os

resultados obtidos por derivar um trabalho estruturado e bem conduzido fornecem uma correta descrição da situação epidemiológica da brucelose bovina nos municípios estudados.

De uma população de 39576 fêmeas bovinas e bubalinas adultas foram coletas 491 amostras de 64 propriedades, sendo 28 localizadas em Pinheiro, 15 em Santa Helena e 18 em Turilândia. Os dados foram agrupados quanto à procedência, espécie e finalidade conforme tabelas 4 e 5.

Tabela 4 efetivo de fêmeas com mais 24 meses segundo espécies e procedências

Municípios	Vacas		Búfalas	
	Existentes	Amostradas	Existentes	Amostradas
Pinheiro	13440	163	2208	71
Santa Helena	6289	96	7	0
Turilândia	15780	161	20	0
Totais	35509	420	2235	71

Fonte: AGED

Tabela 5 Distribuição de animais examinados por finalidades e municípios de procedência

Finalidade principal	Município de procedência			Total
	Pinheiro	Santa Helena	Turilândia	
Leite	28	0	10	38
Carne	206	96	151	453
Total	234	96	161	491

O resultado dos exames laboratoriais para brucelose é apresentado nas tabelas 6 e 7

Tabela 6 Resultado dos exames sorológicos por municípios de procedência.

Teste AAT	Município de procedência			Total
	Pinheiro	Santa Helena	Turilândia	
Negativo	221	93	152	466
Positivo	13	3	9	25



Total	234	96	161	491
Prevalência (%)	5,5	3,1	5,6	5,1

Tabela 7 Resultado dos exames sorológicos quanto a espécie e finalidade da exploração.

Categorias		Teste AAT		Prevalência
		Negativo	Positivo	
Espécie	Bubalina	68	3	4,2
	Bovina	398	22	5,2
Finalidade principal	Leite	38	0	0
	Carne	428	25	5,5

O cálculo da prevalência foi realizado segundo Hosner (2015) dividindo o número de amostras reagentes ao teste sorológico pelo número de amostras examinadas. Assim, obteve-se prevalência animal de brucelose de 5,1% e a prevalência nos rebanhos (focos) foi de 31,25% (20/64).

Não houve diferença significativa de prevalência entre as espécies ( $\chi^2$  0,129, gl =1, p=0,72), nem entre propriedades com duas espécies (bovinos e bubalinos) no mesmo ambiente ( $\chi^2$  = 1,75, p=0,186). O ambiente de várzea em que, principalmente, os búfalos permanecem durante um período do ano na baixada maranhense não apresentou efeito significativo na prevalência de brucelose ( $\chi^2$  = 1,4(1) p=0,23). Segundo Marques e Cardoso (1997) este ambiente oferece adequadas condições para sobrevivência das brucelas, expondo os bubalinos, que possuem hábito de banhar-se e pastear nessas águas, a elevado risco de infecção. Fosgate et al (2002) acrescenta que bovinos e bubalinos apresentam características epidemiológicas distintas. Os resultados, portanto, não detectaram os fenômenos apontados pelos autores.

Não foi possível confirmar a associação entre seroprevalência e tipo exploração (carne e leite) pois nenhuma soro proveniente de vacas leiteiras reagiu ao teste, possivelmente, devido ao reduzido número de amostras coletada na categoria. Borba et al (2013) encontrou baixa frequência de propriedade de leite na baixada maranhense. Neste assunto, Radostits et. al. (2002) afirmam que rebanhos leiteiros por serem submetidos a constantes renovações do plantel apresentam maior risco de infecção e, Batista (2019) aponta finalidade leiteira como fator de risco para brucelose, em búfalos.

A frequência de infecção brucélica nos três municípios estudados foi estatisticamente semelhante apresentando os seguintes valores comparativos no teste de independência: Pinheiro contra Santa Helena e Turilândia ( $\chi^2$  = 0,917(1) p=0,408; Santa Helena contra Pinheiro e Turilândia

( $\chi^2 = 0,705$  (1)  $p=0,45$ ) e Turilândia contra Pinheiro e Santa Helena ( $\chi^2 = 0,093$  (1)  $p=0,836$ ). Isto sugere homogeneidade na distribuição da brucelose nos três municípios.

As prevalências de brucelose nos grupos 1 (coletado nas propriedades rurais) e 2 (coleta nos abatedouros) foram de 4,8 e 5,4 (respectivamente), estatisticamente iguais ( $\chi^2=0,095$  (1)  $p=0,758$ ). Embora estes dois grupos populacionais tenham características diferentes, os resultados sugerem que ambos os processos de amostragem podem ser usados, indistintamente, na baixada maranhense, em estudos epidemiológicos. A FAO (2003) recomenda realização de coletas nas propriedades quando os níveis de prevalência na população sejam altos, caso contrário, pode-se coletar nos mercados ou abatedouros, desde que os dados da origem dos animais sejam preservados.

No presente estudo, a prevalência de brucelose alcançou um valor intermediária aos relatados por outros autores, no estado do Maranhão: Chaves *et al.*,(2015), 18% em búfalas. Sousa (2016) 1.19%, em bovinos abatidos em matadouros da Região de Imperatriz e Açailândia; Prazeres (2009) 3,94; Borba (2012) 2,52%; Carvalho (2014) 4,95; Dutra (2015) 2,21%; Lima (2015) 8,4% e Rocha (2016) 9, 27%; e em outros Estados: 6,2% no RN (de FREITAS *et al.*, 2008), 8,54 % em TO (OGATA, 2009); e no PA, 4,18 em bovino (SILVA *et al.* 2014) e 6,8 em búfalos (BATISTA *et al.* 2019)

É necessário considerar a prevalência de brucelose mais elevada em fêmeas, observado por Freitas e Oliveira (2005) e Santos (2007). Isso ocorre segundo os autores, porque, os machos são levados ao abate mais jovens, permanecendo, portando, por menor tempo expostos a situações de risco sanitário.

## 5.1 ANÁLISE UNI VARIADA

A escolha dos fatores de exposição inseridos na análise teve como referência as condições ambientais e manejos comumente encontrados na região e a literatura (Santana, (2010); Alencar, (2016); Almeida (2016); Batista (2019); Borba (2012); Sousa, (2019), Prazeres, (2014); Silva, (2018). Na análise uni variada, cada variável independente foi confrontada com a variável resposta (resultado dos exames sorológico) para verificar existência de associação. O teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado ou teste exato de Fisher, nos casos de frequência esperada menor que 5.

Tabela 8 análise univariada de fatores de risco para brucelose em rebanhos bovídeos nos municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia.

Variáveis	Resultado ao teste AAT	p Valor
-----------	------------------------	---------

		Negativo	Positivo	$\chi^2$	
Aquisição de bovinos nos últimos 12 meses	Não	333	13	4,317	0,038
	Sim	133	12		
Compartilhamento de reprodutores	Não	347	20	0,385	0,535
	Sim	119	5		
Movimentação entre propriedades do mesmo proprietário	Não	319	15	0,780	0,377
	Sim	147	10		
Aluguel de pasto para terceiros	Não	400	18	3,589	0,058
	Sim	66	7		
Acesso a pastos comuns	Não	353	20	0,235	0,628
	Sim	113	5		
Acesso a áreas alagadiças - várzeas	Não	341	21	1,435	0,231
	Sim	125	4		
Contato com animais da propriedade vizinha	Não	250	14	0,053	0,818
	Sim	216	11		
Contato com mamíferos domésticos ou selvagens	Não	32	1	0,311	0,577 <sup>b</sup>
	Sim	434	24		
Oferecimento de ração ou sal mineral	Não	191	12	0,481	0,488
	Sim	275	13		
Recolhimento dos animais a noite	Não	119	7	0,075	0,784
	SIM	347	18		
Abate de na propriedade	NÃO	401	19	1,938	0,164
	SIM	65	6		
Vacinação regular contra brucelose	Não	365	17	1,465	0,226
	Sim	101	8		
Exames periódicos de brucelose	Não	411	20	1,486	0,223
	Sim	55	5		
Aborto na propriedade nos últimos 12 meses	Não	274	9	5,005	0,025
	Sim	192	16		
Destruição de placenta e tecidos fetais	Não	449	23	1,208	0,272 <sup>b</sup>
	Sim	17	2		
Historio de brucelose na propriedade	Não	417	20	2,181	0,140
	Sim	49	5		

Tamanho do rebanho (60 cab.).	Menor 60 cab.	210	5	6,056	,014
	= ou mais 60cab	256	20		

\*. A estatística qui-quadrado é significativa no nível 0 ,2.

Os resultados da análise uni variada mostram que as variáveis aquisição de bovídeos, compartilhamento de touros, aluguel de pasto, ocorrência de aborto nos últimos 12 meses, histórico de brucelose e tamanho do rebanho maior que 60 cabeças obtiveram nível de significância estatística inferior a 0,20 ( $p < 0,2$ ) e seguiram para a análise multivariada.

## 5.2 ANÁLISE MULTIVARIADA

As variáveis predictoras selecionadas na etapa anterior foram inseridas no modelo de regressão logística obtendo os seguintes resultados:

Tabela 9 análises multivariada de fatores de risco para brucelose em rebanhos bovídeos nos municípios de Pinheiro, Santa Helena e Turilândia

Variáveis	B	p_valor	RC	95% C.I. para EXP(B)	
				Inferior	Superior
Aquisição bovinos nos últimos 12 meses(1)	1,197	0,006	3,310	1,407	7,786
Aborto na propriedade nos últimos 12 meses(1)	1,152	0,011	3,164	1,306	7,665
Tamanho do rebanho (60 cab.)(1)	1,123	0,030	3,075	1,116	8,470
Constante	-4,736	0,000	,009		

B – coeficiente de X

SE – Erro padrão

gl – graus de liberdade

Sig – significância valor de p

Exp(B) – Razão de chances (OR)

CI – intervalo de confiança para  $\alpha=95\%$

Os valores encontrados (tabela 9) na análise de regressão logística indicaram que as variáveis V1, v16 e V17 apresentam significância estatística ao nível de confiança de 95% com  $p < 0,05$  e foram consideradas previsoras de infecção por *brucella abortus* nos rebanhos examinados. As demais variáveis por apresentar valores de B (coeficiente de X) não diferentes estatisticamente de 0,0 foram excluídas do modelo final. Não houve fatores de proteção.

Valores de Razão de Chances maiores que 01 representam risco de indivíduos pertencentes à categoria de rebanhos expostos testarem positivo para brucelose em relação aos indivíduos pertencente à categoria de rebanhos não expostos.

A associação entre aquisição de animais e positividade para brucelose, notadamente quando se desconhece a condição sanitária do rebanho de origem foi constatada por Dias et al (2009). Para ele o risco encontra-se na introdução de animais sem realização de testes diagnósticos. De Oliveira (2013) constatou associação de brucelose e compra de bovinos (RC= 5,25). Segundo Crawford, Huber & Adans (1990), fatores determinantes dessa associação são a frequência de compras, a origem dos animais e número de testes sorológicos.

Compartilhamento de touros, aluguel de pastos e uso de áreas comuns (não cercadas) são práticas adotados na região em estudo que não mostraram associação com brucelose, ratificando a importância da aquisição de animais como fator de risco para esta enfermidade. Todos os animais testados eram provenientes de propriedades localizadas no Maranhão, mas não foi averiguada a origem dos mesmos. Santos *et al.* (2007), perceberam que animais provenientes de outros estados apresentaram maiores proporções de reagentes (7,5% contra 3,23 autóctones) .

A variável aluguel de pasto apresentou associação estatística apenas na análise inicial (uni variada). O perigo de infecção, segundo Crawford, Huber & Adans, (1990). provém de contaminação de ambiente por líquidos e tecidos eliminados durante o aborto e parto de fêmeas infectadas pois o agente causador pode permanecer viável por um período de até 6 meses. Borba (2013) relatou associação de aluguel de pastagem com ocorrência de brucelose (RC=1,8) e acrescenta que essa prática possibilita contato entre rebanhos livres e infectados. Souza (2012) verificou relação deste manejo com brucelose bovina no estado de Roraima (RC=2,2)

A variável histórico de abortamentos na propriedade tem sido constatada por outros autores. O aborto de fêmeas brucélicas constitui-se em um dos principais meios de contaminação do ambiente e portanto de disseminação da bactéria dentro e entre propriedades vizinhas, pois o agente pode ser transportada por diversos meios, como águas, animais e veículos. Santana (2010) e Sousa (2019) no Maranhão, demonstraram associação de ocorrência de aborto e brucelose bovina com RC= 9,06 e RC= 11,4 respectivamente.

Por outro lado, há que se considerar que o aborto possui diversas causas conhecidas. O modelo estatístico não apenas considera os casos positivos entre rebanhos que tem histórico recente de aborto, mas, também, aqueles que testaram negativos mesmo possuindo fêmeas que abortaram

nos últimos 12 meses. Assim, outras causas de aborto não foram desconsideradas no cálculo estatístico, confirmando a rejeição da hipótese nula, quanta a esta variável.

Nesse contexto, Vasconcelos (1987) ensina que os canídeos são capazes de transportar produtos de aborto pelas pastagens e, até, entre propriedades vizinhas. Acrescenta-se uma reduzida frequência de produtores (2/64) que afirmaram realizar destruição de placentas e tecidos de aborto e parto, corroborando com dados encontrado por de Santana (2010).

Quanto a variável “tamanho do rebanho” verificou-se que indivíduos pertencentes a rebanhos com mais de 60 cabeças expõem-se a um risco 3 vezes maior de serem infectados quando comparados aos rebanhos menores. Este fator de risco foi percebido por outros pesquisadores. Dias (2009) *et al.* constataram associação em rebanhos com mais de 87 cabeças no estado de São Paulo. Borba (2012), no Maranhão, verificou que propriedade com mais de 54 fêmeas tinham maior risco. Almeida (2016) relata associação de rebanhos com mais de 13 fêmeas e brucelose bovina, no estado de Pernambuco (RC 2,65) e, Oliveira (2016), em Minas Gerais, percebeu que rebanhos com mais de 30 animais apresentavam maior risco de contrair brucelose

Algumas possíveis explicações para este fenômeno são: (i) associação positiva com aquisição de animais de reposição; (ii) problemas no controle sanitário de grandes rebanhos e, (iii) maior possibilidade de interações entre os indivíduos dos rebanhos maiores ( CRAWFORD, HUBER, ADANS, 1990)

Rebanhos maiores têm mais movimentação com entradas mais frequentes, não raramente, provenientes de outros estados para reprodução ou terminação. Rebanhos pequenos têm mais contatos entre si (compartilhamento de touros, acesso a campos comuns e aluguel de pastos). Portanto, os dados sugerem que a movimentação entre propriedades distantes pode representar um risco maior que o deslocamento dos animais entre propriedades vizinhas.

### 5.3 QUALIDADE DO MODELO

A regressão logística tem sido amplamente utilizada na área da saúde para testar fatores de risco de enfermidades. Na bibliografia consultada, todos os trabalhos envolvendo fatores de risco para brucelose utilizaram este modelo matemático. Para que os dados sejam analisados corretamente e que a saída do modelo seja confiável é necessário que, além da qualidade dos dados epidemiológicos, haja um cuidado na avaliação da qualidade do modelo.

Para isso, foi realizados exame de colinearidade entre as variáveis independentes pelo método FIV e os testes de Hosmer e Lemeshow e análise de curva ROC. Destaca-se que a determinação de fatores de risco objetiva caracterizar doenças e suas formas de transmissão favorecendo a eficácia dos programas de controle e erradicação pois possibilita atuação e direcionamento de recursos aos pontos mais sensíveis da cadeia de transmissão.

### 5.3.1 COLINEARIDADE

O teste de multicolinearidade entre as variáveis independentes que permaneceram no modelo final de regressão logística apresentou os seguintes resultados.

Tabela 10 teste de colinearidade entre as variáveis independentes do modelo final de regressão logística

Modelo	Coeficientes		
	Beta	Sig.	VIF
(Constante)		0,210	
Aquisição bovinos nos últimos 12 meses	0,141	0,002	1,089
Aborto na propriedade nos últimos 12 meses	0,136	0,003	1,082
Tamanho do rebanho (60 cab.)	0,119	0,008	1,007

a. Variável Dependente: Resultado ao teste AAT

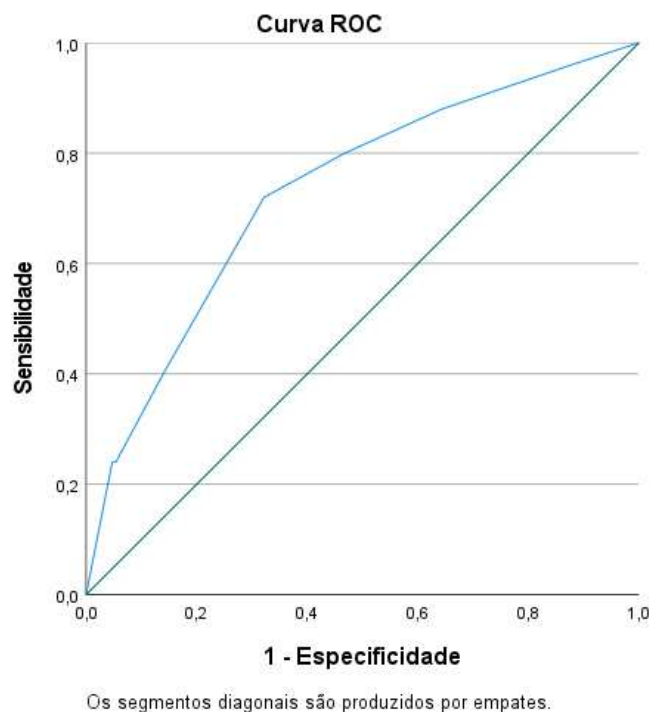
Os números demonstram que não houve de correlação elevada entre variáveis independentes incluídas no modelo utilizado pois os valores de FIV de todas as variáveis foram inferiores a 10. De acordo com Fiel (2011) estes valores indicam ausência de multicolinearidade entre variáveis.

O teste Hosmer e Lemeshow apresentou valor de  $\chi^2 = 0,901$   $p=0,97$  indicando adequação do modelo estatístico utilizado na previsão de casos de brucelose na população estudada. Este teste tem como hipótese nula que número de casos observados é, estatisticamente, igual ao número de casos previstos.

### 5.3.2 ANÁLISE DA CURVA ROC

Testar a acurácia do modelo de regressão logística foi traçada a curva ROC comparando-se a proporção de casos corretamente previstos (eixo x) com a proporção de casos incorretamente previstos (eixo Y). a curva ROC apresentou a seguinte configuração:

Figura 7 Curva ROC do modelo final de regressão logística.



Variável dependente resposta resultado do exame de AAT

Variáveis independente: aquisição, aborto e tamanho dos rebanhos

Tabela 11 valores da área sob a curva ROC - teste de probabilidade.

Área	Erro padrão <sup>a</sup>	Sig. assintótico <sup>b</sup>	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
			Limite inferior	Limite superior
0,731	0,053	0,000	0,627	0,834

a. Sob a suposição não paramétrica

b. Hipótese nula: área verdadeira = 0,5

O valor da área sob curva (0,731 CI 0,627 -0,834) indica uma capacidade razoável do modelo na previsão de casos de bruceloses bovina nesta população. Isso significa que um animal selecionado ao acaso entre aqueles pertencentes ao grupo dos positivos tem maior probabilidade de está infectado do que outro indivíduo escolhido aleatoriamente no grupo negativo em 73,3% das vezes. O resultado demonstra o acerto do modelo em prever corretamente rebanhos positivas e negativas para brucelose.

Assim, as variáveis que compõem o modelo final de regressão logística juntas contribuem em 73,1% para a infecção de rebanhos bovinos e bubalinos nos municípios restando quase 27% atribuíveis a outros fatores não incluídos na análise.

Como limitação desta pesquisa a que se considerar que em muitos casos não há como se verificar a exatidão das informações fornecidas pelos produtores rurais como ocorrência de aborto,



vacinações contra brucelose e realização de exames, tempo e número de aquisição de animais e até número de animais nas propriedades. Assim, novas pesquisas deverão ser realizadas para elucidar fatores envolvidos na ocorrência de brucelose bovina na região da baixada maranhense.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a brucelose está presente nos municípios de pinheiro, santa helena e Turilândia, acometendo indistintamente bovinos e bubalinos. A prevalência encontrada em fêmeas com mais de 24 meses de idade foi 5,1% e nas propriedades examinadas foi de 30,25%.

Os fatores risco associados à brucelose na população estudada foram aquisição de bovinos tanto para engorda quanto para reprodução, histórico de abortamentos recentes nas propriedades e rebanhos grandes (com mais de 60 cabeças).

O risco de infecção por *brucella abortus* associado a aquisição de animais pode ser influenciado pela ausência de realização prévia de exames laboratoriais de brucelose e consequente desconhecimento das condições sanitárias dos rebanhos de origem, pois constatou-se baixo índice vacinal e reduzida frequência de realização exames de brucelose.

A existência de casos anteriores de aborto associada à presença de brucelose e acompanhada de baixa frequência de criadores que realizam destruição de resíduos de abortos e partos sugere que há desconhecimento do produtor rural quanto as formas de transmissão da doença e a necessidade de melhor orientação.

O modelo de regressão logística se mostrou com moderada capacidade de prever novos casos de brucelose bovina. O valor da área sob a curva ROC= 0,73 indica que em 27% dos casos, as variáveis testadas não explicam a ocorrência de brucelose bovina nos rebanhos estudados. Assim, a ocorrência de infecção por *brucella abortus* na área em estudo pode ser influenciada por outros de fatores de risco não incluídos nesta proposta de modelo. É necessário testar outras variáveis.

Ressalta-se, a contribuição do emprego da curva ROC para o aperfeiçoamento do modelo logístico utilizado na verificação fatores risco para brucelose. Esta ferramenta permite melhor compreensão dos fenômenos ambientais e de manejo envolvidos na transmissão da enfermidade sendo útil aos programas sanitários na definição de prioridades no direcionamento de recursos às propriedades de maiores risco como aquelas com maior frequência de entrada de animais, com histórico de abortamentos e com maiores rebanhos.

Desse modo, recomenda-se para o controle, erradicação e prevenção da brucelose no Estado do Maranhão ênfase na adoção de medidas de educação sanitária voltadas para orientação de produtores quanto à compra e venda de animais acompanhados de documento sanitário e precedidas de exames laboratoriais de brucelose e sobre a importância da destruição resíduos fetais e placentários oriundo de parto e aborto para evitar a disseminação do agente causador da doença.

A cobertura vacinal , é essencial aumentar a cobertura vacinal contra brucelose principalmente nas propriedades e rebanhos de maior risco.

Há necessidade urgente de adequação de abatedouros de bovinos e bubalinos e implantação de serviço de inspeção sanitária nos municípios pois a elevada prevalência de brucelose entre os animais abatidos nesses estabelecimentos representa risco á saúde do consumidor.

## 7 REFERÊNCIAS

1. ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed. . v.1. Washington, D.C.: **Organización Panamericana de la Salud**, 2001.
2. AFFONSO, I. B. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (bOhv-1) nas dez regiões de planejamento do estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4. 2010.
3. ALMEIDA, P. DE A.; REIS, D. O.; GERMANO, M. L. Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob federal. **Cienc. Rural**. v.30 n. 2. Santa Maria Mar./Apr. 2000. disponível em <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782000000200015&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782000000200015&script=sci_arttext)>. Acesso em 23 de outubro de 2014.
4. ALMEIDA, E. C.; FREITAS, A. A.; PONTUAL, K. A. Q.; SOUZA, M. M. A.; DIAS, M. A.; AUGUSTO, R.; FERREIRA, F.; TELLES, E. O.; HEINEMANN, M. B.; GONÇALVES, V. S. P.; EVÊNCIO-NETO, J.; MARVULO, M. F. V.; GRISI-FILHO, J. H. H.; FERREIRA NETO, J. S.; SILVA, J. C. R. **Prevalence and associated risk factors for bovine brucellosis in the state of Pernambuco, Brazil**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3413-3424, 2016
5. ALENCAR R.D.R., SILVA R. DE S. DA, MOREIRA R.B., FONTES Q.M., SÁ L.P. DE, BESERRA, P. A.; BRAGA; G. M. DA S., SANTOS, H. P. & MELO, F. A. **Brucelose: epidemiologia e fatores de risco da *brucellaabortus* no rebanho bovino do Sudoeste Maranhense**. Universidade Estadual do Maranhao. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Curso de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidades Estadual do Maranhao. São Luís, 2016.
6. ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v.51, n.2, p.57-63, 1978. Disponível in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/809027/> acessado em 10-10-2020.
7. AZEVEDO, S.S.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; SOUZA, A.C.; VASCONCELLOS, S.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.61 supl.1 Belo Horizonte Nov. 2009. Disponível in [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352009000700004&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352009000700004&script=sci_arttext). Acessado em 11-10-2020.
8. BATISTA, H.R.; PASSOS, C.T.S.; NUNES NETO, O. G.; SARTURI, C.; COELHO, A. P. L.; MOREIRA, T. R.; MORINI, A. C.; NEVES, K. A. L.; CASSEB A. D. R.; GENNARI, S. M.,

MINERVINO, A. H. H. Factors associated with the prevalence of antibodies against *Brucella abortus* in water buffaloes from Santarém, Lower Amazon region, Brazil. **Transboundary and Emergency disease**. 2019. p. 1-5. Disponível in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31231951/> acessado em 05/10/2020.

9. BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. 380p.

10. BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Journal Veterinary Quarterly**. Vol. 20.ed..3. Jul., 1998. p.81-88 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9684294/> acessado em 11-10-2020.

11. BONITA, R.; BEAGLEHOLE, T. KJELLSTRÖM. Epidemiologia básica; [tradução e revisão científica Juraci A. Cesar]. 2.ed. Santos, 2010. 213p.

12. BORBA, M. R. **Characterization of bovine brucellosis in Maranhao State. [Caracterização da brucelose bovina no Estado do Maranhão]**. 2012. 81f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2012. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-09102012-151041/fr.php> acesso em 01 de maio de 2019.

13. BRASIL. **Inquérito Soroepidemiologia da Brucelose: Manual de procedimentos. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**, MAPA/SDA/DDA, Ministério da Agricultura, Recuaria e Abastecimento, Brasília. 24p. 2001.

14. BRASIL. **Instrução Normativa SDA n. 10, de 3 de março de 2017**. Aprova o regulamento técnica do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e de Tuberculose Animal. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 14 out. 2018.

15. BRASIL 2006. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, RECUARIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Manual Técnico**. Brasília, DF, 2006.188p.

16. BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**. vol.90 n.1-4, p. 435-446. 2002 Disponível: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00228-6). Acessado: 10-10-2020..

17. CARDENAS, L.; PEÑA, M. MELO, O.; CASAL, J.; Risk factors for new bovine brucellosis infections in Colombian herds. **BMC Vet Res**. Vol. 15. n.81. 2019. Disponível in . <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1825-9>. Acessado em 05-10-2020.

18. CHAVES, N. P. BEZERRA, D.C.; Dos SANTOS, L.S.; SA, J. S.; SANTOS, H. P.; PE-REIRA, H. de M. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesq. Vet. Bras**. Vol.32. n.2. p.131-134. Fev., 2012. Disponível

in [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2012000200007&script=sci\\_arttext&tlng=p](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2012000200007&script=sci_arttext&tlng=p).  
acesso em 14-10-2020

19. CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Rev- Emerging Infectious Diseases**.. Vol. 3. N. 2. Apr-Jun.: 1997. p.213-221. Disponível in : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9204307/> acessado em 10-10-2020.

20. CORRÊA W.M. & CORRÊA C.N.M. 1992. **Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. Ed. São Paulo: Ed. Medsi. p.195-215.

21. COSTER. R., TORMAN, V. B. L., CAMEY, S. A. Um alerta sobre o uso de amostras pequenas na regressão logística. A warning about the use of small samples in logistic regression. **Revista HCPA**. 2012; vol. 32. N. 1. p. 102-111. Disponível in <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/27267/16646>. Acessado in 11-10-2020.

22. CRAWFORD, R.P., HUBER, J.D., ADAMS, B.S. **Epidemiology and surveillance**. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Eds.), **Animal Brucellosis**. CRC Press, Boca Raton, USA, 1990. p. 131–151.

23. DA SILVA, T. I. B.; DE MORAES, R. S.; SANTOS, P. de S.; RECKZIEGEL, G. H.; GOMES, Y. A.; MELCHIOR, L. A. K.; FERNANDES, A. C. DE C.; BAPTISTA FILHO, L. C. F. DA SILVA, D. D. REVOREDO, R. G.; MELO DE, L. E. H.; Analysis of the risk factors for bovine brucellosis in dairy herds of the Rio Branco microregion, Acre, Brazil. [Arquivos do Instituto Biológico](#). São Paulo. vol. 86. p 1-6. 2019. Disponível: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000792018> acessado em 05-10-2020.

24. DE CARVALHO, R. F. B.; SANTOS, H. P.; MATHIAS, L. A.; PEREIRA, H. DE M.; PAIXÃO, A. P.; COSTA FILHO, V. M.; ALVES, L M C. Frequência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e em seres humanos na região central do estado do Maranhão, Brasil. **Arq. Inst. Biol.** [online]. São Paulo. Vol.83. Dez. 2016. Disponível in <https://doi.org/10.1590/1808-1657001042014>. Disponível in [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572016000100239&lng=pt&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572016000100239&lng=pt&tlng=pt) acessado em 05-10-2020.

25. DE FREITAS, A. D.; CALVACANTI, A. S.; MARQUES, A.S.C; MESQUITA, F.P.N., AMORIM, A.S.; LEITE, I. L. Prevalência de brucelose em bovinos na Região do Potengi, Estado do Rio Grande do Norte. **Acta veterinária Brasilica**. v.2, n.4, p. 118-122, 2008. disponível: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/download/912/691/> acesso em 04-08-2019

26. DE OLIVEIRA, R. M.; SILVA, M. L. C. R.; MACÊDO, M. M. S.; HIGINO, S. S. dos S; PAULIN, L. MA.; ALVES, C. J.; DE CARVALHO, M. das G. X.; DE AZEVEDO, S. S. Soroepi-

demiologia da leptospirose e brucelose bovina em propriedades rurais de agricultura familiar do agreste paraibano, Nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. vol.80 n..3. Jul/set. 2013

27. DEMARIS, A. A Tutorial in Logistic Regression. **Journal of Marriage and the Family** p.956-968. Nov.1995. Disponível em <http://www.jstor.org/stable/353415>. Acessado em 08-10-2020.

28. DIAS, R.A. GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LOBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIM, L.M.S.; GUNNEWICK, M.F.K.; AMAKU, M. FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológico da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.61 supl.1 Belo Horizonte. Nov. 2009. disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352009000700015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000700015) acesso em 04-08-2019.

29. FAN, J.; UPADHYE, S.; WORSTER, A. Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. **CJEM**. Jan; vol. 8. n.1, 2006 p. 19-20. Disponível in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17175625/> acessado em 09-10-2020.

30. FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH. Emergency prevention system food and agriculture organization of the united nations. **Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance Paper 156**. Prepared by Robinson, A. Roma, 2003.

Disponível em <http://www.fao.org/3/a-y4723e.pdf> acessado em 17-10-2020.

31. FIELD, A. **Descobrimo a estatística usando o SPSS** [recurso eletrônico]/ tradução Lorí Viali. – 2. ed. – Dados eletrônicos. Porto Alegre: Artmed, 2009.

32. FICHT ,T. A. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. **Veterinary Microbiology**. Volume 92, ed. 3, n.2. abril, 2003. p. 213-223.

33. FOSGATE GT, ADESIYUN AA, HIRD DW, JOHNSON WO, HIETALA SK, SCHURIG GG, RYAN J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Am J Vet Res.**; vol. 6. n.11. p.1598-1605. Nov. 2002. Disponível in <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2002.63.1598> Acesso em 04-10-2020.

34. FONTELLES, M. J., SIMÕES, M. G., ALMEIDA, J. de C.; FONTELLES, R. G. S. METODOLOGIA DA PESQUISA: DIRETRIZES PARA O CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA. **Revista Paraense de Medicina** V.24 (2) abril-junho 2010. Disponível em <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-593646>. Acessado em 08-10-2020.

35. FRANCO, M. P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; SMITS, H.L. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**. Dez; vol.7 ed.12. 2007. p.775-786.

36. GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI,G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DIVENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for diagnosisof brucellosis in

water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. **Veterinary Record**, v.149, p.88-90, 2001. Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/11848214\\_Indirect\\_ELISA\\_for\\_the\\_diagnosis\\_of\\_brucellosis\\_in\\_water\\_buffaloes\\_Bubalus\\_bubalis\\_in\\_Italy](https://www.researchgate.net/publication/11848214_Indirect_ELISA_for_the_diagnosis_of_brucellosis_in_water_buffaloes_Bubalus_bubalis_in_Italy). Acesso em 04-10-2020.

37. GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIER, T.; NICOLAS, C.; WATTIAU, P.; FRETIN, D. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Prev Vet Med.** 2011. p.102:118.

38. GWIDA, M.; NEUBAUER, H.; ILHAN, Z.; SCHMOOCK, G.; MELZER, F.; NÖCKLER, K. Cross-border molecular tracing of brucellosis in Europe. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2012; p. 35:181.

39. HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S.; KLAR, J. Goodness-of-fit Testing for the Logistic Regression Model when the Estimated Probabilities are Small. **Biometrical Journal.** 30 (1988) 8,911-924. Disponível in: <https://doi.org/10.1002/bimj.4710300805>. Acessado em 09-10-2020.

40. ISLAM, M. A.; KHATUN, M. M.; WERRE, S. R.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYLE, S.M.; A review of *Brucella* seroprevalence among humans and animals in Bangladesh with special emphasis on epidemiology, risk factors and control opportunities. **Vet Microbiol** 2013;166:317-26.

41. JUFFO, G.D. **Aborto em bovinos: principais causas infecciosas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Trabalho de conclusão de curso.2010. Porto Alegre, 2010. disponível em <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39020/000792782.pdf?sequence=1>. Acesso em 14 de outubro de 2018.

42. LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. S. Decisões clínicas e a teoria da detecção de sinal. In: **Métodos em neurociência**. 2012.

43. LEMESHOW, S.; HOSMER, Jr. D. W. A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. **Ambhican journal or epidemiology. Vol. 115, No 1. 1982.** Disponível in: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/115/1/92/136332>. Acessado em 09-10-2020.

44. WORLD HEALTH ORGANIZATION; LWANGA, S.K.; LEMESSHOW, S. **Sample size determination in health studies: a pratica manual**. Geneva, 1991.

45. KEPPIE J., WILLIAMS A.E., WITT K. & SMITH H. The role of erythritol in tissue localization of the *Brucellae*. **British journal of experimental pathology**. Fev. vol. 46, n.1. 1965. p.104–108. Disponível in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2093692/> acessado em 10-10-2020.

46. MARANHÃO, 2019. Estratificação do rebanho do estado do Maranhão. Relatório final da etapa I de vacinação de bovinos contra febre aftosa do Estado do Maranhão. Programa de prevenção e erradicação de febre aftosa. Coordenadoria de Defesa Animal. Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão.



47. MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, vol.1. **Anais**. Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 1997. p.10-221.
48. MCDERMOTT J.J. & ARIMI S.M. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. **Veterinary Microbiology**. vol. 90. n 1–4, dez. 2002. p. 111–134. Disponível <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113502002493>. Acessado em 10-10-2020.
49. MCDERMOTT, J.; GRACE, D. & ZINSSTAG, J. Economics of brucellosis impact and control in cow income countries. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, vol. 32. n.1, p. 249-261. 2013 Disponível in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23837382/>. Acesso em 08-10-2020.
50. MCGIVEN, J.A. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, vol. 32. 163-176. 2013. Disponível in: <https://doc.oie.int/dyn/portal/index.seam?page=alo&aloId=31518>. Acesso em 08-10-20.
51. MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J. Vasc. Bras.** Porto Alegre. vol. 10. n.4. Dez.2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>. Acessado em 18-10-2020.
52. MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.22, n.2, p.41-44, 2002.
53. MOTA, A. L. A. A. **Fatores de Risco para Brucelose no Brasil**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, 2011. 73 p. Dissertação de mestrado.2011.
54. MUNIZ, L. M. **A criação de Búfalos na Baixada Maranhense: uma análise do desenvolvimentismo e suas implicações socioambientais**. III jornada internacional de políticas públicas, 2007, p.1-6. Disponível em : <http://www.joinpp.ufma.br/jornadas/joinppII/html/Trabalhos/EixoTematicoI/Eixo%209%20a117d7fcc8043a5882d9lLenir%20Moraes%20Muniz.pdf> Acesso em: 04 de outubro de 2018.
55. NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved cELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.48, p.285-295, 1995. Disponível in <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016524279405361U?via%3Dihub>. Acesso em 04-10-2020.
56. NIELSEN K, GALL D, JOLLEY M, LEISHMAN G, BALSEVICIUS S, SMITH P, NICOLETTI P, THOMAS F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **J Immunol Methods**. vol. 195. n.1-2. p161-8. Sep.1996. Disponível in <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8814332/> acesso em 04-10-2020

57. NICOLETTI, P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**. Vol. 24. p.40–44. mar.1992. Disponível in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02357235>. Acessado:10-10-2020.
58. OEI. **Manual Terestre. Brucelosis** (*Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. Suis*) (infección por *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. Suis*). 2018. Disponível em <http://the-icsp.prg/subcoms/Brucella.htm>. Acesso em 09/05/2019.
59. OLIVEIRA, L F; DORNELES, E. M. S.; MOTA, A. L. A. DE A.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; GRISI-FILHO, J. H. H.; MARCOS BRYAN; HEINEMANN, M. A.; LAGE, A. P.; Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Minas Gerais State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 5, suplemento 2, p. 3449-3466, 2016. disponível em : file:///C:/Users/josew/Documents/mestrado/bibliografia/factor%20risco%20bruceloses%20minas%20gerais.pdf. Acesso: 08-04-2019
60. PAULIN, L.M., PRADO, G.E.S., FEDERSONI, I.S.P., TEIXEIRA, A.C., CASTRO, V., GENOVEZ, M.E., Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, vol. 69, n.4, p.41-47. out./dez., 2002. Disponível em file:///C:/Users/josew/Documents/mestrado/bibliografia/paulin%20tes%202me.pdf. Acessado em 20/04/2019.
61. PAULIN, L.M.S. Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-25092007-101838/en.php>. Acesso em 18-10-2020
62. PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. BRUCELOSE EM BÚFALOS. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.3, p.389-401, jul./set., 2008. Disponível em [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v75\\_3/paulin.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v75_3/paulin.pdf) . Acesso em 18-10-2020.
63. PENG, C. J.; LEE, K. L.; INGERSOLL, G. M. An Introduction to Logistic Regression Analysis and Reporting. **The Journal of Educational Research**. September/October 2002 [Vol. 96(No. 1)]. Disponível in <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00220670209598786>. Acessado em 09-10-2020.
64. PETRIE, A., WATSON. P. **Estatística em ciência animal e veterinária**. 2. ed. São Paulo:Roca, 2009.
65. PINTO, M. R. A., FAGLIARI J. J., MATHIAS, L. A., MEGID, J., SALGADO V. R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de

complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *brucella abortus*. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, Vol. 21, Suplemento, p147-154. 2005. disponível em file:///C:/Users/josew/Documents/mestrado/biografia/att%20teste.pdf . Consulta em 20/04/2019.

66. PLUMB, G.E., OLSEN, S.C. & BUTTKE, D. Brucellosis: 'One Health' challenges and opportunities. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, , vol. 32. p 271-278. 2013 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23837384/> acessado em 08-10-2020.
67. POESTER, F P; Samartino, L E ; Santos, R L pathogenesis and pathobology of brucellosis in livestock **Rev scientifique et technique** (International Office of Epizootics), April 2013, Vol.32(1), pp.105-15.
68. POESTER, F.; FIGUEIREDO V.C.F. <sup>II</sup>; 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [online]. 2009, vol.61, suppl.1, pp.01-05. ISSN 1678-4162. Disponível in [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352009000700001&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352009000700001&script=sci_abstract&tlng=pt). Acessado in 11-10-2020.
69. PRAZERES, M. P. C. de S.; SANTOS. A. M.; CHAVES, N. P.; CARVALHO-NETA, A. de. V. Prevalency and Risk Factors Associated with Brucellosis in Cattle in the Municipality of São Francisco do Brejão, Maranhão, Brazil. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**. Volume 3, n.2, ISSN (Online) 2319-1473. Disponível in [http://ijair.org/administrator/components/com\\_jresearch/files/publications/IJAIR\\_956\\_Final.pdf](http://ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_956_Final.pdf) f. Acessado em 05-10-2020.
70. QUINN, P.J. MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Artmed, 2005. p. 166 – 171.
71. RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Clínica Veterinária**, 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1877p
72. ROCHA ALENCAR, R. D. Brucelose: epidemiologia e fatores de risco da *brucella abortus* no rebanho bovino do sudoeste maranhense. **Dissertação** (Mestrado). 2016. Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016. 76f. Disponível em <http://www.cienciaanimal.uema.br/images/diss/diss-2016/reylan.pdf> acesso em 01 de maio de 2019.
73. SAMARTINO, L. E.; M. ENRIGHT F. E. *BRUCELLA ABORTUS* DIFFERS IN THE MULTIPLICATION WITHIN BOVINE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE EXPLANTS FROM EARLY AND LATE GESTATION. **Comp. Immun. Microbiol infect. Dis.** Vol. 19, No. 1, pp. 55-63, 1996. disponível EM

- file:///C:/Users/josew/Documents/mestrado/bibliografia/samartino%201996.pdf. Acesso: 09-04-2019.
74. SANTANA, S. S. Soroepidemiologia da *Brucella abortus* em rebanhos bovinos na região do Cerrado do Estado do Maranhão. **Dissertação** (Mestrado). 2010. Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão. São Luís, 2010. 82p.
75. SANTOS, H.P.; TEIXEIRA, W.C.; OLIVEIRA M.M.M.; PEREIRA, H. M.; OLIVEIRA, R.A.; NEGREIROS R.C., SOAREAS FILHO P.M. SANTANA, S. S. & C ASTRO R.S. Brucelose bovina e humana diagnosticada em matadouro municipal de São Luís /MA. **Brasil. Cienc. Vet. Trop.** Vol.10. n.2. p. 86-p4.2007. Disponível em [http://www.rcvt.org.br/volume10\\_2\\_3/86-94.pdf](http://www.rcvt.org.br/volume10_2_3/86-94.pdf). Acessado em 18-10-2020.
76. SANTOS, R. L.; MARTINS, T.M.; BORGES. Á. M.; PAIXÃO, T.A.; Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesqui Vet Bras.** 2013; 33:759-64. .
77. SMITS, H.L. Brucellosis in pastoral and confi ned livestock: prevention and vaccination. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 2013, vol.32. n.1. p219-228. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23837379/> acesso em 08-10-2020.
78. SOUSA, A. K. A.; SANTOS H.P. **Brucelose bovina em matadouro com serviço de inspeção sanitária federal e municipal no estado do Maranhão**. São Luís, 2016. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Maranhão.
79. SOUZA, L.P.A.; BRASIL, A.W.L.; PARENTONI, R.N., AZEVEDO, E.O.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S. BRUCELOSE BOVINA NO ESTADO DE RORAIMA: ESTUDO RETROSPECTIVO. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.79, n.3, p.319-325, jul./set., 2012. ISSN 1808-1657. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000300001>. Acessado em 05-10-2020.
80. UNITED STATES. Department of Agriculture .National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis Facts about brucellosis**. Disponível em:<<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em: 04-10-2020..
81. VIANA, L.; BATISTA, F.; TELES, J.; RIBEIRO, A.P.C.; PIGATTO, C. P. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins. **Brasil. Arq. Ins. Biol.** São Paulo, vol. 77, n.3, p.517-520, jul./set., 2010. Disponível em [http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77\\_3/viana.pdf](http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/viana.pdf) acessado em 18-10-2020.
82. VASCONCELLOS, S.A.; ITO, FH.; CÔRTEZ, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal.**Comunicação Científica da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo**, v.11, n.1, p.25-36,1987.





FOTO1: bufalos



FOTO 2 búfalos e bovinos



FOTO 3 bovinos



FOTO 4 bufalos



FOTO 5 bovinos



FOTO 6 bovino

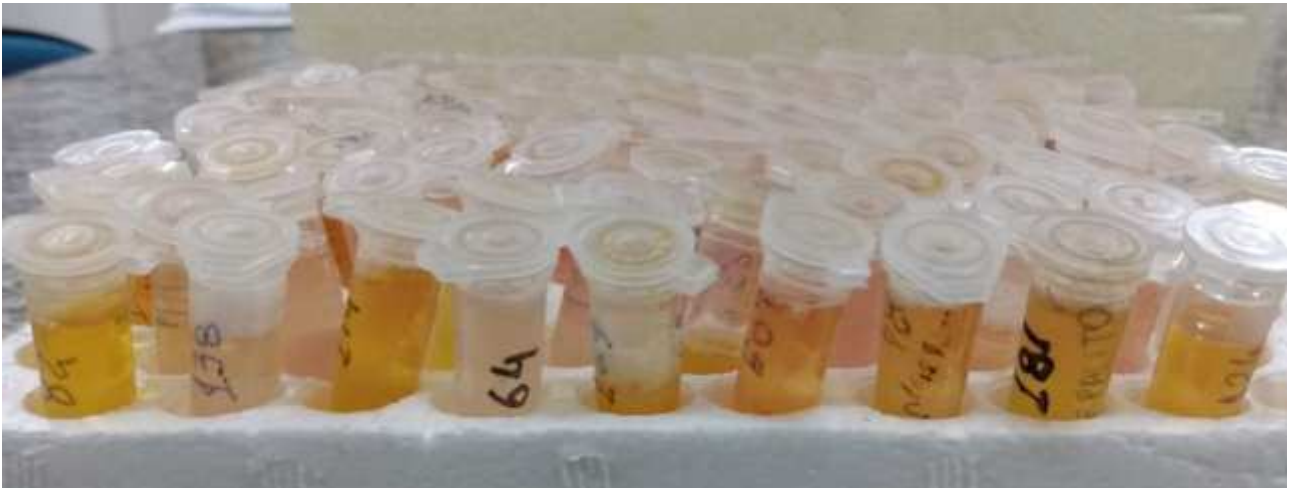


FOTO 7 amostras de soros



Foto 8 teste AAT controle

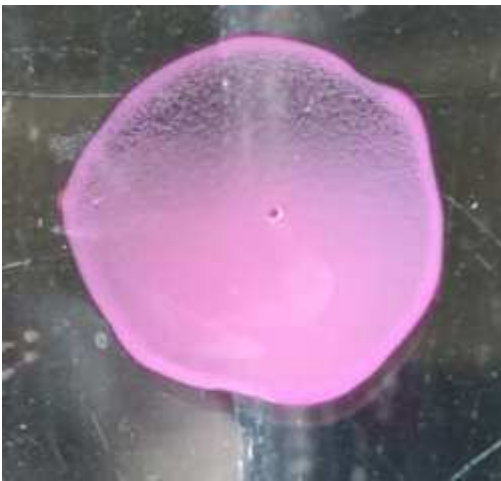






Foto 9 teste amostra positiva AAT



	
Foto 10 teste AAT amostra positiva	Foto 11 teste aat amostra positiva
	
Foto 12 materiais utilizados	13 materiais utilizados

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
FORMULÁRIO EPIDEMIOLOGIA

Município			Data da visita	
Prop (nome)		Coordenadas		Código
Rebanho por Faixa etária (em meses)				Finalidade principal
	Faixa etária	Menor 24meses	Maior 24 meses	
Especie	Bovina			Leite ()    carne ()
	Bubulina			Leite ()    carne ()

Perguntas		Respostas	
		Não 0 Sim 1	observações
1.	Foram adquiridos animais nos últimos 12 meses?		
2.	Houve compartilhamento touros?		
3.	Ocorreu saída e retorno a propriedade?		

4.	Houve aluguel de pastos de /para terceiros?		
5.	Acesso a campos comuns?		
6.	Acesso as áreas alagadas?		
7.	Há contato com animais do vizinho?		
8.	Tem contato com outras espécies de mamíferos?		
9.	Fornece ração ou sal a cocho?		
10.	O rebanho é recolhido a noite?		
11.	Abate na propriedade?		
12.	Realiza vacinação brucelose?		
13.	Realiza exames periódicos?		
14.	Houve Ocorrência de aborto nos últimos 12?		
15.	Realiza destruição de placenta e restos fetais?		
16.	Há histórico de brucelose na propriedade?		

Local e data \_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIA AGRARIAS  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

Formulário de coleta e acompanhamento de amostras

Propriedade código

Num.	Animal cod.	Nome	Resultado ATT	Resultado 2ME
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				

10.
11.
12.
13.
14.
15.

Local e data \_\_\_\_\_

Responsável pela coleta \_\_\_\_\_ CRM \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

### APÊNDICE III

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TECLE)

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do estudo intitulado “CRIAÇÃO EXTENSIVA DE BOVINOS E BÚFALOS NA BAIXADA MARANHENSE: análise de fatores de riscos para infecção por *Brucella abortus* nos municípios de Pinheiro e Santa Helena, Ma.”, que será realizada nos municípios de Pinheiro e Santa Helena, no estado do Maranhão, cujo pesquisador responsável é o Sr(a) dr. Hamilton Pereira Santos (orientador), médico Veterinário, professor do Programa de Pós-graduação em Defesa Sanitária Animal da Universidade Estadual do Maranhão.

Os pesquisadores adotarão as seguintes medidas para minimizar os riscos: contenção adequada dos animais; coleta em horários de boas condições de tempo evitando-se os períodos de chuva e calor intenso; as visitas serão, preferencialmente, agendadas para as datas coincidentes com maneja sanitário habitual do rebanho (vacinação, vermifugação, marcação etc).

O participante poderá contar com assistência de médico-hospitalar das cidades de Pinheiro e Santa Helena-MA.

O participante poderá ser ressarcido(a) por qualquer despesa que venha a ter com a sua participação e, também, indenizado por todos os danos que venha a sofrer pela mesma razão.

Tendo o(a) participante compreendido perfeitamente tudo o que lhe foi informado sobre a sua participação no mencionado estudo e, estando consciente dos seus direitos, das suas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a sua participação implica, o(a) mesmo(a) concorda em dela participar e, para tanto eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO O(A) MESMO TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço do participante voluntário(a):

Cidade: .....Telefone: .

Ponto de referência:

Instituição:

Universidade Estadual do Maranhão

---

Assinatura ou impressão datiloscópica do(a) Participante da pesquisa

HAMILTON PEREIRA SANTOS \_\_\_\_\_

RG: Conselho de Classe

---

JOSE WENDEL ARAÚJO SOARES      RG: 521687969

**9**



