

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA

LUCIANO SANTOS DOS SANTOS

APLICAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS NA IDENTIFICAÇÃO DE
FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA NO RECÔNCAVO DA BAHIA

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO - 2024

LUCIANO SANTOS DOS SANTOS

**APLICAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS NA IDENTIFICAÇÃO DE
FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA NO RECÔNCAVO DA BAHIA**

Bacharel em Medicina Veterinária

Universidade Federal da Bahia - 2000

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária na Área de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Coorientadora: Dra. Luciana Nieldsberg de Ávila

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO - 2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

S237a

Santos, Luciano Santos dos.

Aplicação de testes laboratoriais na identificação de focos de brucelose bovina no Recôncavo da Bahia / Luciano Santos dos Santos. _ Cruz das Almas, Bahia, 2024.

60f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira.

Coorientadora: Dra. Luciana Nieldsberg de Ávila.

1.Bovino – Doenças – Brucelose em bovinos. 2.Bovino de leite – Veterinária. 3.Recôncavo (BA) – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.208842

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

FOLHA DE APROVAÇÃO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA - UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA
AGROPECUÁRIA**

APLICAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS NA IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA NO RECÔNCAVO DA BAHIA

Comissão Examinadora da Qualificação de Mestrado de Luciano Santos dos Santos

Aprovado em 07 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Orientador

Profa. Dra. Veridiana Fernandes da Silveira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
Examinador Interno

 Documento assinado digitalmente
MARIA TEREZA VARGAS LEAL MASCARENHAS
Data: 21/10/2024 15:26:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Tereza Vargas Leal Mascarenhas
Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB)
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família e meus colegas da ADAB.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre, toda honra e glória a Ele.

À minha esposa, Mary Lúcia e meus filhos Maylu, Lucas, Emanuela e Vitória pela paciência, compreensão e incentivo.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Maria das Graças, pelo amor, educação e incentivo.

Aos meus colegas da Adab, principalmente os que me incentivaram e me ajudaram: Lousane Cerqueira, Maria Aparecida, Luciana Ávila, Suely Xavier, Adriana Batista, Isabel Mayer, Manoela Barbosa, Verena Souza, Evandro Moraes e Tereza Mascarenhas. Ao estagiário e futuro colega Kauan Nascimento por me ajudar muito no Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRB (LDI-UFRB). Aos professores do Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária, em especial, à professora Ana Karina pelas orientações e ajuda.

Ao Professor Dr. Robson Bahia Cerqueira, pelos ensinamentos e dedicação ao ensino e pesquisa que inspira tanto.

EPÍGRAFE

“Plante o que você realmente espera colher”!

Autor: desconhecido

DOS SANTOS, Luciano Santos. **APLICAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS NA IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA NO RECÔNCAVO DA BAHIA**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2023.
Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

RESUMO

O controle sanitário do plantel é um determinante para uma bovinocultura de qualidade. Dentre os problemas sanitários que atingem os bovinos se encontra a brucelose, causada pela *Brucella abortus*. Além de grande prejuízo econômico, essa enfermidade tem por agravante ser um problema de saúde pública, por se tratar de uma zoonose considerada grave para o ser humano. Nesse contexto a Defesa Agropecuária desempenha papel fundamental, buscando através de sistema de vigilância específico para a brucelose bovina ações como a vacinação obrigatória, o controle de trânsito, saneamento de focos, certificação de propriedades livres de brucelose bovina, o controle e a erradicação da doença. Verificamos a presença da doença em dois sistemas produtivos diferentes: Vacas de leite de propriedades que entregam leite in natura nos laticínios com inspeção estadual (SIE) localizados em municípios do Recôncavo Baiano e vacas de descarte enviadas para o abate no abatedouro com SIE, localizado também nesse Território. Foram coletadas amostras de leite para realização do Teste do Anel do Leite em dois laticínios que recebem leite in natura. No frigorífico, amostras de sangue de vacas de descarte foram dessoradas e submetidas ao Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, e as reagentes ao teste confirmatório de 2-Mercaptoetanol e ao ELISA indireto. O objetivo do estudo é auxiliar o sistema de vigilância epidemiológica por meio de testes laboratoriais na identificação de focos da brucelose bovina na cadeia produtiva do leite e corte do Território do Recôncavo da Bahia.

Palavras-Chave: *Brucella abortus*, Teste do anel do leite, Antígeno acidificado tamponado, 2-Mercaptoetanol, ELISA.

DOS SANTOS, Luciano Santos. **APPLICATION OF LABORATORY TESTS IN THE IDENTIFICATION OF FOCI OF BOVINE BRUCELLOSIS IN THE RECONCAVO DA BAHIA.** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – BA, 2023.
Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

ABSTRACT

The health control of the herd is a determining factor for quality cattle farming. Among the health problems that affect cattle is brucellosis, caused by *Brucella abortus*. In addition to causing great economic damage, this disease is a public health problem, as it is a zoonosis considered serious for humans. In this context, Agricultural Defense plays a fundamental role, seeking, through a specific surveillance system for bovine brucellosis, actions such as mandatory vaccination, traffic control, sanitation of outbreaks, certification of properties free of bovine brucellosis, control and eradication of the disease. We verified the presence of the disease in two different production systems: Dairy cows from properties that deliver fresh milk to dairies with state inspection (SIE) located in municipalities in Recôncavo Baiano and cull cows sent for slaughter at the slaughterhouse with SIE, also located in that Territory. Milk samples were collected to perform the Milk Ring Test in two dairies that receive fresh milk. At the slaughterhouse, blood samples from cull cows were desorbed and subjected to the Buffered Acidified Antigen Test, and the reagents to the 2-Mercaptoethanol confirmatory test and indirect ELISA. The objective of the study is to assist the epidemiological surveillance system through laboratory tests in identifying outbreaks of bovine brucellosis in the milk and beef production chain in the Territory of Recôncavo da Bahia.

Keywords: *Brucella abortus*, Milk ring test, Buffered acidified antigen, 2-Mercaptoethanol, ELISA.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Prevalência de casos de brucelose bovina por UF	26
Figura 2 – Prevalência de focos de brucelose bovina por UF	26
Figura 3 – Mapas do Estado da Bahia e Recôncavo Baiano com localização dos laticínios e abatedouro	37
Figura 4 - Material para coleta de leite para o TAL, sendo preparado em cabine de fluxo laminar	38
Figura 5 - Amostras reagentes e não reagentes no TAL	39
Figura 6 - Municípios onde estão localizadas as propriedades amostradas no AAT	43
Figura 7 - Amostras de soro bovino testadas no Elisa indireto	46
Figura 8 - Mapa da Bahia com a divisão em circuitos produtores: 1 (Sul); 2 (Noroeste); 3 (Nordeste); 4 (Centro)	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Total de amostras regentes e não reagentes ao TAL	42
Tabela 2 - Total de amostras regentes e não reagentes ao teste de AAT.....	42
Tabela 3 - Total de propriedades regentes e não reagentes ao teste de AAT	42
Tabela 4 - Total de amostras com resultado positivo no SAL e 2-ME	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME – 2 Mercaptoetanol

AAT – Antígeno Acidificado Tamponado

ADAB – Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia

ELISA - Ensaio de imunoadsorcao ligado a enzima (*enzyme linked immuno sorbent assay*).

iELISA – ELISA indireto

LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – Minas Gerais

LPS - Lipopolissacarídeo

µL – Microlitro

nm – Nanômetro

PBS-T – Solução tampão fosfato bibásico com twin

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

TAL – Teste do Anel do Leite

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Características do agente etiológico	17
3.2 Transmissibilidade	18
3.3 Resposta imune	19
3.4 Patogenia	21
3.5 Sinais clínicos	22
3.6 Diagnóstico	23
3.7 Ocorrência	25
3.8 Medidas de profilaxia e controle.....	27
3.9 Brucelose e saúde única	28
ARTIGO	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de leite na Bahia é considerada um dos setores mais importantes do agronegócio baiano. Os segmentos de produção, industrialização e comercialização do leite e derivados estão presentes em todas as regiões, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (BAHIA, 2014). O Recôncavo Baiano também tem sua importância na bovinocultura leiteira, com uma produção de mais de 5 milhões de litros em 2019 (BRASIL, 2020a).

A manutenção da sanidade dos rebanhos é fundamental da produção animal e depende diretamente das condições gerais do manejo praticado nas propriedades (CUNHA et al., 2012). Mesmo buscando aumentar cada vez mais sua produtividade, o Brasil precisa melhorar a qualidade dos seus produtos de origem animal, principalmente na área sanitária, por isso os programas de sanidade animal que busca o controle e a erradicação de doenças, como a brucelose, através de vacinações e profilaxia são fundamentais para o país se manter competitivo como exportador (UFLA, 2012).

A brucelose bovina é uma zoonose de ampla distribuição, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de se constituir em um sério problema de saúde pública, não só para os consumidores, mas também por ser uma doença de caráter ocupacional, onde todas as espécies de *Brucella* podem infectar o homem, mas a brucelose bovina causada pela *Brucella abortus* é a que causa maior preocupação, visto que a bovinocultura é muito expressiva em qualquer região do país (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2015)

A cada 1% de variação na taxa de prevalência de brucelose bovina no Brasil, estima-se em R\$ 155 milhões o custo da doença. Essas perdas econômicas comprometem mais de 0,3% do produto interno bruto (PIB) brasileiro gerado por animais de produção (SANTOS et al., 2013).

Nesse contexto, a Defesa Agropecuária desempenha papel fundamental, buscando através de sistemas de vigilância específicos realizar ações de vacinação obrigatória,

controle de trânsito, saneamento de focos, certificação de propriedades livres, o controle e a erradicação da doença (BRASIL, 2020b).

Atualmente, os sistemas de vigilância ocupam um papel central no combate de doenças em populações animais. São estruturas que exigem o domínio de métodos epidemiológicos e profundo conhecimento, tanto da doença alvo, como do ambiente onde será implementado. Esses sistemas geram informações sanitárias populacionais que servirão de base para tomada de decisões. Para as doenças que acometem os animais de produção, devem ser elaborados e geridos por um consórcio de parceiros constituído por todos os atores interessados no processo: produtores rurais, indústria transformadora e de insumos veterinários, serviços veterinários oficiais e consumidores (CALLEFE e FERREIRA NETO, 2020).

Diante desse cenário, esse trabalho visa identificar focos dentro de dois sistemas de vigilância para a brucelose bovina no Recôncavo Baiano, utilizando o teste do anel do leite em laticínios e o AAT (Antígeno Acidificado Tamponado), 2-ME (2 Mercaptoetanol) e ELISA indireto (Ensaio de imunoadsorcao ligado a enzima) em vacas de descarte abatidas no abatedouro com SIE localizado em Santo Antônio de Jesus, onde os resultados são de real interesse para o Serviço Oficial de Defesa da Bahia. Os resultados podem dar subsídios a Defesa Agropecuária Oficial para reavaliar as ações frente a essa doença de grande importância para a pecuária e também para a saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Auxiliar o sistema de vigilância epidemiológica por meio de testes laboratoriais na identificação de focos da brucelose bovina na cadeia produtiva do leite e corte do Território do Recôncavo da Bahia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar em laticínios através do Teste do Anel do Leite (TAL), a situação da brucelose bovina no Recôncavo da Bahia.
- Monitorar através da sorologia pelo teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), a situação da brucelose no rebanho bovino abatido no matadouro com inspeção estadual (SIE) do Recôncavo da Bahia.
- Aplicar um teste Elisa indireto para comparação com os resultados obtidos nos testes AAT e 2-ME com a finalidade de estabelecer o potencial do ELISA como um teste de triagem para o Programa de controle da doença.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE ETIOLÓGICO

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Brucella abortus*, um parasito intracelular facultativo, fazendo com que a doença tenha um caráter crônico. Elas conseguem sobreviver dentro de células fagocíticas, se adaptando e passando pelas defesas imunes normais do hospedeiro (BALDWIN e GOENKA, 2006).

Brucellas são cocobacilos ou bastonetes curtos que medem de 0,6 a 1,5 µm de comprimento e de 0,5 a 0,7 µm de largura. Morfologicamente a *Brucella* é bastante estável, exceto em culturas antigas onde as formas pleomórficas podem ser visíveis. *Brucella* são imóveis. Eles não formam esporos e flagelos, pili ou cápsulas verdadeiras não são produzidos e são Gram negativos (WOAH, 2022).

Bactérias do gênero *Brucella*, dividem-se em 07 espécies diferentes, sendo elas: *B. suis* – suínos, *B. canis* – cães, *B. melitensis* – caprinos e ovinos, *B. abortus* – bovinos, *B. ovis* – ovinos, *B. neotomae* – ratos do deserto e a *B. maris* – focas e leões marinhos, golfinhos e baleias. A maioria das espécies de *Brucella* já foram encontradas no ser humano exceto *B. ovis*, *B. notomae* e *B. maris* (FERREIRA, 2019).

As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* normalmente apresentam morfologia de colônia lisa, podendo sofrer mutações para formas rugosas ou mucóides, deixando de ser patogênicas. As espécies *B. canis* e *B. ovis* apresentam morfologia de colônia predominantemente do tipo rugosa. As colônias lisas possuem como constituinte do LPS (lipo poli sacarídeo), o lipídeo A, o núcleo oligossacárido e a cadeia O. Já as rugosas, possuem como constituinte da membrana externa apenas o lipídeo A e o núcleo oligossacárido (LAGE et al., 2008; WOAH, 2022)

A *Brucella* utiliza a inibição da fusão fagossoma-lisossoma além de impedir a apoptose da célula hospedeira para conseguir sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos (ARENAS et al., 2000; DORNELES et al., 2015). Elas sobrevivem fixadas nos compartimentos localizadas dentro das células fagocíticas, reticulo endoteliais e

células epiteliais especializadas (OLIVEIRA, 2012). A *Brucella* também consegue infectar células dendríticas (BILLARD *et al.*, 2007). Entretanto, os macrófagos são as principais células de residência no hospedeiro para a *Brucella* (CORBEL, 1997). Para permanecer dentro das células fagocíticas e também em algumas células não fagocíticas, como os trofoblastos placentários a *Brucella* sintetiza enzimas antioxidantes além de produzir guanosina 5' e adenina que irão inibir a fusão do lisossomo e fagossomo, o que impede a degranulação dos macrófagos durante a fagocitose, não ocorrendo, portanto, a destruição do agente infeccioso. (NETA *et al.*, 2010; XAVIER *et al.*, 2010)

As bactérias do gênero *Brucella* são muito resistentes aos fatores ambientais. *B. abortus* pode permanecer por seis meses ou mais em material de aborto ou parto nas pastagens. A sobrevivência destas bactérias no ambiente aumenta em determinadas condições como estar à sombra, umidade e baixas temperaturas (LAGE *et al.*, 2008).

3.2 TRANSMISSIBILIDADE

A transmissão do agente etiológico ocorre inicialmente pela ingestão de materiais contaminados, e a introdução no rebanho ocorre pela aquisição de animais que não apresentam sintomas e cronicamente infectados, ocorrendo também infecções congênitas (*in útero*) ou perinatais podendo dar origem a infecções latentes (MEGID; MATHIAS; ROBLES, 2010). A transmissão também pode ser adquirida pela via respiratória e por contaminação via pele e mucosas (WHO, 2006).

Em bovinos a bactéria é geralmente transmitida de um animal para outro por contato após aborto, onde são eliminadas grandes quantidades de bactéria ou através do pasto e água infectados, por isso é a principal fonte de infecção, sendo a via digestiva uma importante porta de entrada, tendo como outras possibilidades de infecção através da inalação, da inoculação conjuntival ou através de copos de ordenha infectados (WHO, 2006; ALVES JÚNIOR, 2017; CONCEIÇÃO, 2017)

Azevedo *et al* (2009), cita que uma importante fonte de infecção para a brucelose bovina é a comercialização de sêmen procedentes de algumas propriedades que se

dizem centrais mas que na verdade são propriedades que vendem o sêmen, sem a realização do controle sanitário dos animais doadores.

Para Monteiro (2006), a transmissão da brucelose bovina entre rebanhos se deve principalmente ao fato da aquisição de animais infectados e pela proximidade de rebanhos com animais doentes que compartilham alimento e água. Já dentro do rebanho a doença vai depender do nível de vacinação dos animais, tamanho do rebanho, condições higiênicas das instalações e pela alta densidade populacional.

A principal fonte de infecção é a vaca prenhe que esteja infectada, que vai eliminar no ambiente grande quantidade da bactéria quando após o parto ou aborto. A monta natural não parece ter muita importância na disseminação da brucelose bovina, devido ao sêmen ser depositado na vagina, onde existem defesas que dificultam o processo de infecção (BRASIL, 2004).

A grande quantidade de bactérias eliminadas no parto ou aborto, associado com sua grande resistência no ambiente, dependendo das condições ideais e a ingestão de leite contaminados por parte dos bezerros, são as formas de transmissão mais importantes para os animais mais vulneráveis do rebanho, associado ao hábito que os bovinos possuem de lambar o bezerro recém-nascido ou fetos abortados, o que contribui para a disseminação da doença no rebanho (CONCEIÇÃO, 2017; LAGE et al., 2008).

A persistência da brucelose no rebanho tem como um importante fator, a infecção latente em bezerras nascidas de mães infectadas. Elas nascem aparentemente saudáveis, mas ao se tornarem adultas e prenhes podem abortar e serem reagentes aos testes sorológicos (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2015).

3.3 RESPOSTA IMUNE

Após as *Brucellas spp* adentrarem o organismo da espécie susceptível, estimulam uma resposta inata devido a adesão à mucosa local que é responsável pelo reconhecimento de estruturas microbianas (LPS, peptídeosglicanos e lipoproteínas),

favorecendo a fagocitose do agente e a posterior expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essas estruturas apresentam baixa toxicidade para os macrófagos, baixa pirogenicidade, baixa atividade ferrogênica, reduzida indução de citocinas e não ativam o sistema complemento (CONCEIÇÃO, 2017).

O reconhecimento de microrganismos intracelulares como a *Brucella* por células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas, resulta na ativação dessas células. Essa ativação aumenta a eficiência da apresentação antigênica além de induzir a produção de citocinas como TNF- α e IL-12 que possuem várias ações em diferentes tipos celulares. A morte de fagócitos mononucleares infectados com *Brucella* juntamente com a ativação de fagócitos mononucleares por interferon são os principais mecanismos de defesa que o hospedeiro utiliza contra a brucelose em bovinos (ABBAS *et al.*, 2015; TIZARD, 2014).

As *Brucellas* spp., estimula uma resposta inflamatória fraca quando comparada com outras bactérias como *Salmonella* spp. Elas produzem um lipopolissacarídeo que possui propriedades endotóxicas fracas, permitindo que escapem de receptores do tipo Toll do sistema imune inato e células sentinelas de superfícies mucosas e inibem as vias de sinalização de Toll que levam a inflamação, bloqueando a secreção de citocinas, afetando as respostas imunes inata e adaptativa (LAPAQUE *et al.*, 2006; SALCEDO *et al.*, 2008; CIRL *et al.*, 2008).

A resposta imune em bovinos infectados por *B. abortus* se caracteriza pelo aparecimento primeiramente da imunoglobulina IgM que aumenta rapidamente até declinar por volta dos 21 dias, mas com níveis detectáveis. A IgG1 vem em seguida e mesmo após a sua concentração máxima, não declina, sendo o anticorpo mais importante para o diagnóstico. A IgG2 e a IgA também aparecem mas em níveis baixos. Essas imunoglobulinas são dirigidas principalmente contra a cadeia "O" do LPS da membrana da *Brucella*. (DE CARVALHO, 2014; KALTUNGO *et al.*, 2014).

De acordo com XAVIER (2010), estudos recentes mostraram que a *Brucella* provoca apenas respostas inflamatórias moderadas, o que provavelmente é o resultado de estratégias tanto para se manter indetectável ao sistema imune do hospedeiro.

3.4 PATOGENIA

Após penetrar no hospedeiro, as *Brucellas* são fagocitadas e transportadas para os linfonodos regionais, onde ocorre a multiplicação que pode causar hiperplasia e linfadenite. A partir daí vão para outros linfonodos, principalmente o supramamário e tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, tais como baço e fígado. Os locais de preferência da bactéria para habitar são os tecidos os tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores, devido a maior disponibilidade de eritritol, um poli álcool composto por quatro carbonos utilizado como fonte de energia pelas *Brucelas* (PAULIN e FERREIRA NETO 2008).

A *Brucella* após infectar o hospedeiro se localiza primariamente nos tecidos linfáticos que estão mais próximos da porta de entrada e após uma rápida bacteremia, entra nas células epiteliais e fagocitárias onde utilizam mecanismos para sobreviver e se multiplicar, se localizando em tecidos preferenciais como os órgãos reprodutivos do macho e da fêmea, placenta, feto e glândulas mamárias, podendo se estabelecer em outros órgãos como linfonodos, baço, fígado e articulações (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2015; RADOSTITS, 2006; PAULIN e FERREIRA NETO, 2008).

A *Brucella* penetra na célula hospedeira por meio de microdomínios de lipídeos, existentes na membrana. Utilizando este mecanismo, a *Brucella* evita a fusão fagossomo/lisossomo, sendo isso fundamental para a sua sobrevivência nos macrófagos infectados, já que as células do hospedeiro com os microdomínios modificados por substâncias químicas são capazes de eliminar todas as bactérias fagocitadas (JIMENEZ DE BAGUES *et al.*, 2004).

A infecção no útero gestante ocorre por via hematogena, deixando de ser latente no terço final da gestação, devido a condições favoráveis como a maior disponibilidade de metabólitos e o maior desenvolvimento do tecido córion- alantóideano onde ocorre a multiplicação da *Brucella*, sendo liberadas endotoxinas após sua destruição, causando uma placentite e necrose nos cotilédones, o que impede a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, assim como provocam uma grande infecção do feto por *B. abortus* sendo responsáveis pelo aborto. Quanto maior a necrose, maior a chance de ocorrer o aborto, único sintoma aparente na maioria das infecções. Altas

concentrações de eritrítol no útero gravídico é um fator importante para a multiplicação da *Brucella* (BRASIL, 2004; PAULIN e FERREIRA NETO, 2008).

3.5 SINAIS CLÍNICOS

A brucelose em animais jovens e fêmeas não gestantes é geralmente assintomática. Após a infecção por *B. abortus*, as vacas prenhes desenvolvem uma inflamação na placenta geralmente resultando em aborto entre o quinto e o nono mês de gravidez. Bovinos machos adultos podem desenvolver orquite/epididimite e a brucelose pode ser causa de infertilidade tanto nos machos como nas fêmeas. Pode ocorrer o aparecimento de higromas, principalmente nas articulações das pernas. Isso é uma manifestação comum da brucelose em alguns países tropicais e muitas vezes é o único sintoma característico da infecção. As fêmeas com brucelose geralmente abortam apenas uma vez, mesmo sendo esse, o sinal clínico mais marcante da doença, nas gestações seguintes os bezerros podem nascer fracos ou até mesmo saudáveis (WOAH, 2022; XAVIER et al, 2010; BRASIL, 2004).

Em algumas áreas, o aborto é relativamente incomum. Em algumas partes da África, higromas e abscessos são os principais sinais clínicos em rebanhos bovinos nômades ou seminômades infectados com *B. abortus* biovar 3. Há diminuição da produção de leite devido a partos prematuros. A infertilidade geralmente é temporária e muita das vacas afetadas pela doença abortará apenas uma vez além de alguns não serem afetados. O úbere é muitas vezes permanentemente infectado. A eliminação de organismos no leite é frequente (WHO, 2006).

Os machos podem apresentar aumento do volume dos testículos de forma uni ou bilateral, além dos epidídimos, ampolas e vesículas seminais, podendo haver atrofia do órgão afetado devido a inflamação necrosante, levando a infertilidade ou esterilidade. Nas fêmeas, a lactação pode ser diminuída e a retenção da placenta e a metrite secundária são complicações possíveis. As mortes são raras, exceto no feto ou recém-nascido. Outras síndromes documentadas em vários ungulados incluem espondilite e abscessos em vários órgãos (CFSPH, 2018; LAGE et al., 2008).

3.6 DIAGNÓSTICO

A observação clínica e epidemiológica nos dá uma indicação da provável presença da doença num rebanho, o que deve ser confirmado pelo método direto, identificando o patógeno sendo esse, o método mais seguro de diagnóstico. No entanto, a identificação da *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de placentas contaminadas, exsudatos vaginais, sêmen, tecidos de fetos abortados ou leite contaminado (CORBEL et al., 2006).

Os testes diagnósticos para brucelose bovina podem ser diretos ou indiretos. Os métodos diretos são aqueles que demonstram a presença do patógeno através do isolamento da *Brucella*, sendo a prova concreta de que o animal está infectado, mas tem as desvantagens de que nem sempre se consegue isolar a bactéria, além do custo e a indisponibilidade destes métodos. Os métodos indiretos que são aqueles baseados na detecção de anticorpos ou de uma reação de hipersensibilidade, fornecendo um diagnóstico provisório, podendo ocorrer muitos falsos positivos por diversos fatores, inclusive a vacinação. São os métodos utilizados pelos programas oficiais de vigilância, além de serem mais baratos e viáveis. (WHO, 2006; MONTEIRO, 2006).

Todos os testes sorológicos apresentam limitações, não devendo ser usado apenas um, devendo ser analisado as situações epidemiológicas e a espécie afetada. Devendo ser utilizado um teste de triagem e outro confirmatório. Devem ser considerados todos os fatores que afetam a importância do método de teste e os resultados do teste para uma interpretação ou aplicação diagnóstica específica (WOAH, 2022).

A imunoglobulina da classe M (IgM) é o anticorpo predominante na resposta humoral de curta duração contra muitos antígenos bacterianos, sendo responsável por reações cruzadas contra outras bactérias, além da brucela, por isso a grande maioria dos testes diagnósticos indiretos possui modificações para reduzir a atividade desse anticorpo (POESTER; SAMARTINO e LAGE, 2005).

A Instrução Normativa número 10 de março de 2017, do Ministério da Agricultura regulamenta a realização dos testes diagnósticos para a brucelose, onde se prevê que o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) será utilizado como teste de triagem, podendo ser colhido e realizado por médico veterinário habilitado ou oficial. O teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) será utilizado como teste confirmatório, em animais reagentes ao teste do AAT, colhido e encaminhado por médico veterinário ou oficial e realizado na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. Também são preconizados os testes de Polarização Fluorescente e Fixação de Complemento. O Teste do Anel em Leite (“TAL”) poderá ser utilizado pelo serviço veterinário oficial ou por médico veterinário habilitado, para monitoramento de estabelecimentos (BRASIL, 2017).

O AAT é um teste de aglutinação local simples, onde gotas de antígeno corado e soro são misturados em uma placa e qualquer aglutinação resultante significa uma reação positiva. O teste é um excelente teste de triagem, mas pode ser muito sensível para o diagnóstico em animais individuais, particularmente os vacinados. O TAL é um método simples e eficaz. Uma gota de antígeno corado com hematoxilina é misturada com um pequeno volume de leite em um tubo de vidro ou plástico. Se o anticorpo específico estiver presente no leite, ele se ligará ao antígeno e subirá com o creme para formar um anel azul no topo da coluna de leite. O teste é razoavelmente sensível, mas pode não detectar um pequeno número de animais infectados em um grande rebanho (WHO, 2006; WOA, 2022).

Apesar do teste imunoenzimático indireto (ELISAI) não fazer parte dos testes oficiais preconizados pelo PNCEBT, apresentam características como alta sensibilidade e especificidade, tornando-os importantes ferramentas para a identificação de animais positivos para a brucelose. Os países europeus já utilizam esse método (OLIVEIRA, 2014).

O 2-mercaptoetanol é um teste utilizado no Brasil como teste confirmatório, que permite quantificação de IgG anti-*Brucella* devido à inativação de IgM na amostra de teste. Como a presença da IgG geralmente está associada a uma infecção crônica, um resultado positivo com este teste é um forte indicador de brucelose (GERESU e KASSA, 2016). Esse teste apresenta algumas desvantagens como a toxicidade do

mercaptoetanol, onde é preciso uma coifa para sua manipulação, além da possibilidade de degradação do IgG causada por o 2-mercaptoetanol, o que pode resultar em resultados falsos negativos (NIELSEN et al., 2004).

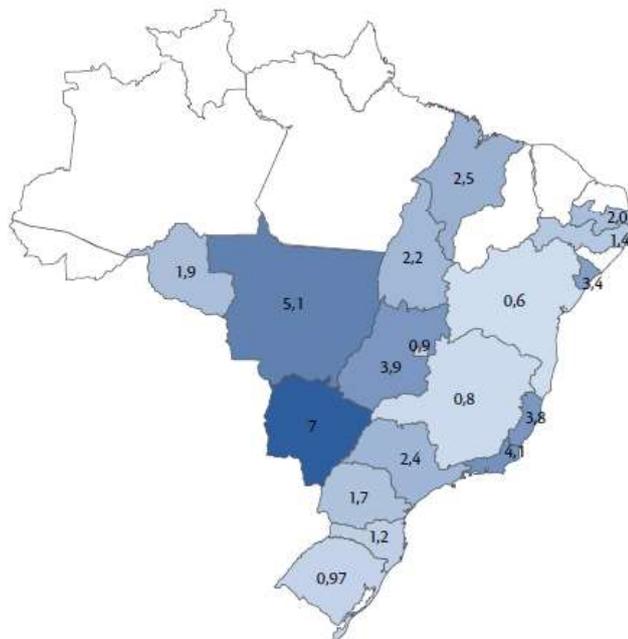
Greve et al. (2007), concluíram em um estudo comparativo entre os testes de AAT, Soroaglutinação Lenta (SAL) e 2-ME, quanto à sua sensibilidade e à especificidade, relacionado ao sorodiagnóstico da brucelose bovina, que o 2-ME demonstrou superioridade em relação ao SAL, com percentual de 100%, mostrando que o teste apresenta resultados seguros para o diagnóstico da brucelose bovina.

3.7 OCORRÊNCIA

A brucelose bovina está presente em todo o mundo com exceção de países como o Canadá, Japão, Nova Zelândia, Israel, Austrália e alguns países da Europa, que conseguiram a erradicação. Na Islândia nunca foi registrada. No Brasil, esta enfermidade é considerada endêmica, com menores índices de prevalência no estado de Santa Catarina. Os Estados Unidos iniciaram seu programa de controle em 1934, e como resultado, em dezembro de 2002 conseguiram erradicar a doença. Se apresenta e maneira mais concentrada em países subdesenvolvidos da África, da América do Sul, do Oriente Médio e da Ásia (CFSPH, 2018; MEGID; MATHIAS, 2015; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; POESTER et al., 2009).

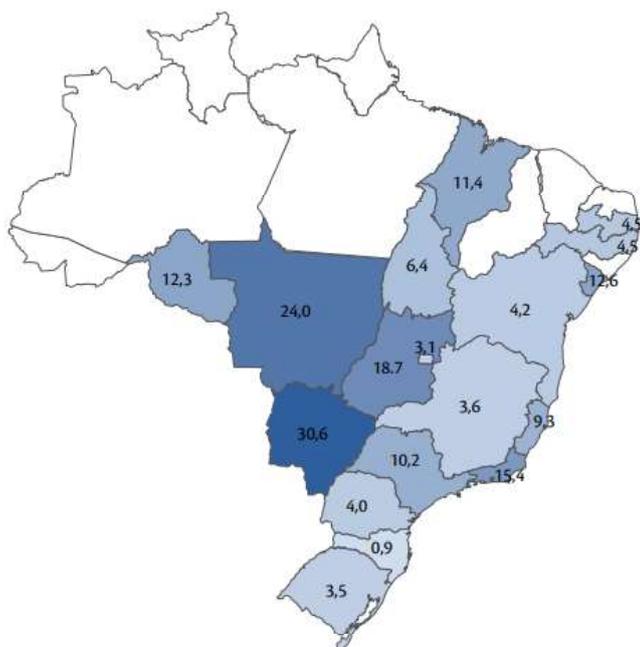
Desde 2001, através do PNCEBT, vários estados brasileiros realizaram inquéritos soropidemiológicos para identificar a prevalência da brucelose bovina, além de fatores de risco, de forma a estabelecer as melhores ações e estratégias para as diferentes UF e regiões. Constatando que a brucelose bovina em todos os estados estudados com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada (BRASIL, 2020b). Os mapas a seguir mostram os resultados dos inquéritos realizados até 2018 (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – Prevalência de casos de brucelose bovina por UF.



Fonte: BRASIL, 2020b.

Figura 2 – Prevalência de focos de brucelose bovina por UF



Fonte: BRASIL, 2020b.

3.8 MEDIDAS DE PROFILAXIA E CONTROLE

Qualquer programa de controle da brucelose bovina, deve-se antes de tudo procurar conhecer a situação epidemiológica do local, através de estudos transversais ou por sistemas de vigilância (FERREIRA NETO, 2018).

A vacinação é importante ferramenta utilizada para redução da prevalência da enfermidade nos rebanhos e do número de abortos, principalmente devido ao seu baixo custo e praticidade dentro de um programa de controle, requerendo um percentual de cerca de 80% de cobertura vacinal de fêmeas, porém outras medidas devem ser utilizadas, principalmente em áreas de baixa prevalência da enfermidade, onde a vigilância ativa para busca, rastreamento e saneamento de focos tem papel fundamental no controle e erradicação da brucelose bovina, isso foi fundamental para a erradicação da doença em alguns países, que além de vacinas confiáveis, também utilizaram testes de diagnósticos com boas especificidade e sensibilidade, além da eliminação dos animais infectados. (MORENO, 2014; SOUZA et al., 2016).

Para que a vacinação seja eficaz no controle é importante que a vacinação com cepa B19 seja empregada em animais jovens, para evitar que os títulos de anticorpos vacinais se prolonguem por um período longo, confundindo assim o diagnóstico. Esse uso deve ser rigorosamente controlado, com uso na idade correta, utilização de vacina de qualidade e em doses suficiente e que esses animais sejam devidamente identificados (WHO, 2006).

Propriedades que vacinam tem menor probabilidade de estar infectada do que aquelas que não cumprem essa norma sanitária. A introdução de novos animais no rebanho com os devidos cuidados sanitários, como a exigência de realização de testes para a brucelose, diminui o risco da doença se instalar, assim como o uso de sêmen produzidos em centrais de inseminação dentro das normas internacionais, devendo os criadores serem orientados pelo serviço oficial de Defesa de cada estado. (GONÇALVES et al., 2009; OGATA et al., 2009; VILLAR et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009; ROCHA et al, 2009; SILVA et al., 2009).

Apesar do PNCEBT não obrigar os produtores para que realizem exames periodicamente em seus rebanhos no Brasil é importante que haja por parte do Estado, o incentivo para que mais produtores possam aderir a essa importante ferramenta do programa, tendo uma maior abrangência, o que resultaria na diminuição da ocorrência dessa enfermidade no país (ALVES JÚNIOR, 2017).

Um programa de controle e erradicação da brucelose bovina deve estar pautado em ações que englobem a identificação e a eliminação dos animais infectados, com a indenização dos produtores para que novos animais possam ser adquiridos. Para isso se deve levar em consideração o montante de recursos financeiros e humanos envolvidos, se tornando um desafio, o que faz com que a prevenção da doença pela vacinação dos animais susceptíveis seja fundamental (LAGE et al., 2008).

Alguns países, a exemplo dos Estados Unidos, utilizam medidas para busca ativa de focos em indústria láctea e abatedouros, através da utilização do teste do anel do leite e coleta de sangue para diagnóstico sorológico em fêmeas adultas, além de medidas educacionais junto à população sobre os riscos da zoonose e treinamento de pessoal dos laboratórios e de campo na interpretação dos resultados (SOUZA et al., 2016).

3.9 BRUCELOSE E SAÚDE ÚNICA

A *Brucella abortus* está entre as principais espécies de *Brucella* que causam a infecção humana, que pode se infectar através do consumo de produtos contaminados como o queijo e o leite não pasteurizados. O homem também pode se infectar através de acidentes com a vacina contra a brucelose, na manipulação de fetos abortados, através da mucosa e pele lesionada e até por aerossóis. Sendo considerada uma doença que atinge principalmente alguns grupos ocupacionais que estão mais expostos aos riscos, como magarefes, veterinários e seus auxiliares, vaqueiros, trabalhadores de laticínios e laboratoristas (MEGID, 2015; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). No Brasil ainda vale ressaltar que no sistema de produção familiar há um contato muito próximo com os animais pode facilitar a transmissão da brucelose, se tornando assim, também como um ocupacional (HOMEM et al., 2016). Infelizmente devido aos sintomas inespecíficos da brucelose em ser humano, poucos

casos são relatados e diagnosticados mesmo em áreas com uma alta prevalência de brucelose em bovinos. O número de casos em humanos pode ser dez vezes maior devido a falta de notificação em infecções com sintomas não específicos, sendo assim, é uma das preocupações de saúde pública mais significativas. (FRANCO et al., 2007; GHANBARI et al., 2020; LAWINSKI et al., 2010).

Apesar de se conhecer pouco a incidência da brucelose no ser humano, sabe-se da importância dessa doença como zoonose devido à sua susceptibilidade ao agente etiológico por isso a Organização Mundial de saúde estima que surjam cerca de 500 mil novos casos, afetando principalmente as pessoas que trabalham com a bovinocultura (BRASIL, 2006; CORBELL, 1997; PAPPAS et al., 2006).

A brucelose em humanos ocorre em todo o mundo, com destaque nos países mediterrâneos da Europa e África, no Oriente Médio, na África, na América Central e na América do Sul, na Ásia Central, na Índia e no México (LAWINSKY et al., 2010).

Observa-se que a transmissão da brucelose do animal para o homem se dá principalmente pelo manejo sanitário inadequado das criações e da insalubridade na prática sistemática com o gado bovino. O setor público responsável se depara com uma grande dificuldade que é identificar e caracterizar a dinâmica da infecção em humanos por não ter técnicas específicas para esse fim, onde os testes sorológicos em humanos são os mesmos aplicados para os bovinos contidos no PNCEBT – Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2004). No ser humano o período de incubação da doença pode variar de uma semana até vários meses (BRASIL, 2006).

A infecção por *Brucella* causa no homem uma febre aguda, podendo causar complicações graves a nível dos sistemas musculoesqueléticos, com incidência entre 40% a 80%, cardiovascular, que é a manifestação considerada a causa mais associada aos casos letais, sendo relatado em 2% dos casos e nervoso central. Se a infecção acontecer devido a ingestão de alimentos contaminados, a brucelose se apresenta com sintomas semelhantes à febre tifoide, com problemas gastrintestinais, com relatos de ileíte, colite e peritonite bacteriana. (CLEMENTINO; AZEVEDO, 2016; KHALAF et al., 2019; LAWINSKY et al., 2010; WOAHA, 2022).

A brucelose nos seres humanos é considerada uma zoonose grave, podendo levar a cronicidade, podendo atingir vários órgãos, causando dores musculares, testiculares e cefaleia, além de impotência sexual, fraqueza, mal-estar, calafrios e artralgia, endocardites, nervosismo e depressão (LAGE et al., 2008; MEGID; MATHIAS; ROBLES, 2010).

No Brasil as infecções estão associadas à *Brucella abortus*, sendo que nunca foi relatado casos de brucelose em humanos por *Brucella melitensis* (BRASIL, 2010). A brucelose em humanos está distribuída em todo o mundo, principalmente em países mediterrâneos europeu, no Oriente médio, África, América Central e América do Sul, Ásia central, Índia e no México. Mesmo em países mais desenvolvidos, apesar da baixa incidência, a brucelose também é encarada como um problema de saúde pública. (LAWINSKY et al., 2010).

O caminho para evitar a infecção do homem pela brucelose é a adoção de programas de combate à brucelose animal, onde países que aplicaram isso vem registrando quedas da incidência da brucelose humana. Mesmo não sendo considerada uma doença muito disseminada nos seres humanos, pode causar uma grave enfermidade nas pessoas infectadas. Além da erradicação da doença animal se faz necessário o combate ao leite e seus derivados clandestinos, implementação da vigilância epidemiológica para detectar casos precoces além da fiscalização do uso de medidas de biossegurança no local de trabalho em profissionais expostos ao risco (MATHIAS, 2008; MUFINDA, BOINAS; NUNES, 2017).

Para que ocorra ações de conscientização e prevenção mais efetiva é necessário que se faça uma caracterização epidemiológica dos principais grupos de pessoas infectadas pela brucelose, buscando assim, minimizar o número de pessoas doentes e conseqüentemente os gastos públicos com tratamentos (CÁRDENAS et al., 2019).

ARTIGO

Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Arquivos do Instituto Biológico

Aplicação de testes laboratoriais na identificação de focos de brucelose bovina no Recôncavo da Bahia

Application of laboratory tests in the identification of foci of bovine brucellosis in the Reconcavo da Bahia

DOS SANTOS, Luciano Santos¹; DE AVILA, Luciana Nieldsberg²; CERQUEIRA, Robson Bahia^{3*}

¹ Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB Território do Recôncavo, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

² Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – Coordenação Estadual do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – ADAB Sede, Salvador, Bahia, Brasil.

³ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

*Autor para Correspondência: robsonba@ufrb.edu.br

RESUMO

O controle sanitário do plantel é um determinante para uma bovinocultura de qualidade. Dentre os problemas sanitários que atingem os bovinos se encontra a brucelose, causada pela *Brucella abortus*. Além de grande prejuízo econômico, essa enfermidade tem por agravante ser um problema de saúde pública, por se tratar de uma zoonose considerada grave para o ser humano. Nesse contexto a Defesa Agropecuária desempenha papel fundamental, buscando através de sistema de vigilância específico para a brucelose bovina ações como a vacinação obrigatória, o controle de trânsito, saneamento de focos, certificação de propriedades livres de brucelose bovina, o controle e a erradicação da doença. Verificamos a presença da doença em dois sistemas produtivos diferentes: Vacas de leite de propriedades que entregam leite in natura nos laticínios com inspeção estadual (SIE) localizados em municípios do Recôncavo Baiano e vacas de descarte enviadas para o abate no abatedouro com SIE, localizado também nesse Território. Foram coletadas amostras de leite para realização do Teste do Anel do Leite em dois laticínios que recebem leite in natura. No frigorífico, amostras de sangue de vacas de descarte foram dessoradas

e submetidas ao Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, e as reagentes ao teste confirmatório de 2-Mercaptoetanol e ao ELISA indireto. O objetivo do estudo é auxiliar o sistema de vigilância epidemiológica por meio de testes laboratoriais na identificação de focos da brucelose bovina na cadeia produtiva do leite e corte do Território do Recôncavo da Bahia.

Palavras-Chave: *Brucella abortus*, Teste do anel do leite, Antígeno acidificado tamponado, 2-Mercaptoetanol, ELISA.

ABSTRACT

The health control of the herd is a determining factor for quality cattle farming. Among the health problems that affect cattle is brucellosis, caused by *Brucella abortus*. In addition to causing great economic damage, this disease is a public health problem, as it is a zoonosis considered serious for humans. In this context, Agricultural Defense plays a fundamental role, seeking, through a specific surveillance system for bovine brucellosis, actions such as mandatory vaccination, traffic control, sanitation of outbreaks, certification of properties free of bovine brucellosis, control and eradication of the disease. We verified the presence of the disease in two different production systems: Dairy cows from properties that deliver fresh milk to dairies with state inspection (SIE) located in municipalities in Recôncavo Baiano and cull cows sent for slaughter at the slaughterhouse with SIE, also located in that Territory. Milk samples were collected to perform the Milk Ring Test in two dairies that receive fresh milk. At the slaughterhouse, blood samples from cull cows were desorbed and subjected to the Buffered Acidified Antigen Test, and the reagents to the 2-Mercaptoethanol confirmatory test and indirect ELISA. The objective of the study is to assist the epidemiological surveillance system through laboratory tests in identifying outbreaks of bovine brucellosis in the milk and beef production chain in the Territory of Recôncavo da Bahia.

Keywords: Keywords: *Brucella abortus*, Milk ring test, Buffered acidified antigen, 2-Mercaptoethanol, ELISA.

INTRODUÇÃO

A pecuária de leite na Bahia é considerada um dos setores mais importantes do agronegócio baiano. Os segmentos de produção, industrialização e comercialização do leite e derivados estão presentes em todas as regiões, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (BAHIA, 2014). O Recôncavo Baiano também tem sua importância na bovinocultura leiteira, com uma produção de mais de 5 milhões de litros em 2019 (BRASIL, 2020a).

A manutenção da sanidade dos rebanhos é fundamental da produção animal e depende diretamente das condições gerais do manejo praticado nas propriedades (CUNHA et al., 2012). Mesmo buscando aumentar cada vez mais sua produtividade, o Brasil precisa melhorar a qualidade dos seus produtos de origem animal, principalmente na área sanitária, por isso os programas de sanidade animal que busca o controle e a erradicação de doenças, como a brucelose, através de vacinações e profilaxia são fundamentais para o país se manter competitivo como exportador (UFLA, 2012).

A brucelose bovina é uma zoonose de ampla distribuição, responsável por consideráveis perdas econômicas, além de se constituir em um sério problema de saúde pública, não só para os consumidores, mas também por ser uma doença de caráter ocupacional, onde todas as espécies de *Brucella* podem infectar o homem, mas a brucelose bovina causada pela *Brucella abortus* é a que causa maior preocupação, visto que a bovinocultura é muito expressiva em qualquer região do país (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2015)

A cada 1% de variação na taxa de prevalência de brucelose bovina no Brasil, estima-se em R\$ 155 milhões o custo da doença. Essas perdas econômicas comprometem mais de 0,3% do produto interno bruto (PIB) brasileiro gerado por animais de produção (SANTOS et al., 2013).

Nesse contexto, a Defesa Agropecuária desempenha papel fundamental, buscando através de sistemas de vigilância específicos realizar ações de vacinação obrigatória, controle de trânsito, saneamento de focos, certificação de propriedades livres, o controle e a erradicação da doença (BRASIL, 2020b).

Atualmente, os sistemas de vigilância ocupam um papel central no combate de doenças em populações animais. São estruturas que exigem o domínio de métodos epidemiológicos e profundo conhecimento, tanto da doença alvo, como do ambiente onde será implementado. Esses sistemas geram informações sanitárias populacionais que servirão de base para tomada de decisões. Para as doenças que acometem os

animais de produção, devem ser elaborados e geridos por um consórcio de parceiros constituído por todos os atores interessados no processo: produtores rurais, indústria transformadora e de insumos veterinários, serviços veterinários oficiais e consumidores (CALLEFE e FERREIRA NETO, 2020).

Diante desse cenário, esse trabalho visa identificar focos dentro de dois sistemas de vigilância para a brucelose bovina no Recôncavo Baiano, utilizando o teste do anel do leite em laticínios e o AAT (Antígeno Acidificado Tamponado), 2-ME (2 Mercaptoetanol) e ELISA indireto (Ensaio de imunoadsorcao ligado a enzima) em vacas de descarte abatidas no abatedouro com SIE localizado em Santo Antônio de Jesus, onde os resultados são de real interesse para o Serviço Oficial de Defesa da Bahia. Os resultados podem dar subsídios a Defesa Agropecuária Oficial para reavaliar as ações frente a essa doença de grande importância para a pecuária e também para a saúde pública.

MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

A área estudada é o Recôncavo da Bahia (Figura 3). As amostras de leite, foram provenientes de dois laticínios com inspeção estadual que recebem leite *in natura*: Um no município de Castro Alves (Laticínio A) que recebe leite de uma propriedade do município de Castro Alves e um laticínio no município de Cachoeira (Laticínio B), que recebe leite de cinco propriedades, sendo uma propriedade de Feira de Santana, uma de São Gonçalo dos Campos, uma de Cachoeira e duas de Sapeaçu. As amostras de sangue para serem dessorados, foram provenientes do abatedouro também com inspeção estadual localizado em Santo Antônio de Jesus, que recebe bovinos de vários municípios da Bahia.

DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado com base na população de animais susceptíveis presentes nas propriedades que fornecem leite para os laticínios A e B e na população de animais abatidos nos meses de agosto, setembro e outubro em 2022. Foram 230 amostras coletadas do Laticínio A, todas de apenas uma propriedade e foram

coletadas 240 amostras do Laticínio B, sendo as amostras proporcionais ao número de vacas da cada uma das cinco propriedades: Propriedade A, 20 amostras (53 vacas), propriedade B, 70 amostras (186 vacas), propriedade C, 43 amostras (116 vacas), propriedade D, 38 amostras (101 vacas) e propriedade E, 69 amostras (185 vacas). No abatedouro foram coletadas 316 amostras de vacas, todas com histórico de vacinação contra a brucelose com a vacina B19.

O total de fêmeas em lactação no período do estudo, provenientes da propriedade que fornece leite para o laticínio A é de 566 animais fêmeas com mais de 36 meses, todas com histórico de vacinação contra a brucelose com a vacina B19, no laticínio B a população de fêmeas das propriedades que fornecem leite para o laticínio B acima de 36 meses é de 641 animais. Já no matadouro, em 2022 abateu 1772 animais no período de agosto a outubro de 2022, período similar ao da coleta do estudo.

Por se tratar de um estudo de prevalência, sendo a análise feita através do Intervalo de confiança (IC) de uma proporção, o cálculo amostral utilizará a fórmula de cálculo do Intervalo de Confiança para determinar o tamanho da amostra necessário. Para tanto o IC adotado foi de 95% (erro máximo de 5%). Foi utilizada uma estimativa de 50% para a característica esperada, sendo que essa estimativa é a maior variabilidade possível pois assim o tamanho da amostra calculado atenderá para qualquer que seja a prevalência encontrada.

COLETA DE AMOSTRAS

Essa pesquisa não necessitou de autorização do Comitê de Ética no uso de Animais CEUA-UFRB, conforme processo número 23007.00027378/2023-90.

As amostras foram identificadas em Laticínio A e B e seguidas das letras correspondente a cada propriedade a partir da letra A, seguidas de uma numeração crescente a partir do número 1(ex.: Laticínio A: A-A-1, Laticínio B: B-A-1). A coleta das amostras aconteceu em um prazo de três meses (agosto, setembro e outubro de 2023) e posteriormente foram feitas as análises e tabulação de dados. As amostras foram coletadas nos latões, caminhão tanque ou tanque de refrigeração correspondentes a cada propriedade através de copinhos de 50 ml descartáveis com

Figura 4 – Material para a coleta do leite para o TAL, sendo preparado no interior de cabine de fluxo laminar.



Fonte: Acervo próprio.

No abatedouro foram colhidas amostras de sangue no momento do abate do animal, na ferida de sangria, foram cerca de 5 ml de cada animal para os testes de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e posterior confirmação pela prova de soroaglutinação lenta (SAL) e 2- Mercaptoetanol (2-ME) e ELISA indireto. O sangue foi dessorado e colocado em tubos eppendorf. Os soros foram congelados e mantidos em congelador do laboratório até a realização dos testes diagnósticos.

PROTOCOLOS DO TESTE DO ANEL DO LEITE, DO AAT, 2-ME E ELISA INDIRETO

Teste do anel do leite (TAL)

O protocolo do TAL seguiu as orientações contidas no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006). Cada amostra foi homogeneizada e em cada tubo de ensaio de tubos 10 mm x 100 mm foram colocados 1 ml (até 150 vacas em lactação) ou 2 ml (151 a 450 vacas em lactação) de leite e adicionado 30 μ L de antígeno para o TAL, que foi produzido e cedido para o estudo pelo LFDA-MG, lote 003/22. A mistura dos tubos foi homogeneizada por inversões repetidas vezes, seguindo para a estufa por 1

hora à 37°C. Considerou-se o resultado do teste como não reagente quando a intensidade da cor do anel foi menor que a da coluna de leite (Figura 5). Considerou-se o resultado do teste como reagente quando a intensidade da cor do anel for igual ou maior que a da coluna de leite (BRASIL, 2017).

Figura 5 – Amostras reagentes e não reagentes no TAL.



Fonte: Acervo próprio.

Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT)

O protocolo do AAT seguiu as orientações contidas no Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006). São utilizados 30µL de antígeno e 30µL de soro, que foram homogeneizados em círculos de 2cm de diâmetro com misturador plástico em placa específica. A placa foi agitada com movimentos oscilatórios por 4 minutos, logo após colocou-se a placa na caixa de leitura. A presença de qualquer aglutinação, a amostra foi classificada como reagente ao teste (BRASIL, 2017). Os antígenos também foram produzidos e cedidos pelo LFDA-MG, lote 01/22 para o AAT e SAL.

Prova do 2-mercaptoetanol (2-ME)

A prova do SAL e do 2-ME seguiu o protocolo do Manual técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006). Os soros reagentes na prova do AAT foram identificados, homogeneizados e submetidos à prova do SAL e do 2-ME. Com a pipeta de Bang, os soros foram colocados em tubos identificados com as respectivas numerações, onde cada amostra possuía 4 tubos, com distribuição de 0,08 ml, 0,04 ml, 0,02 ml, 0,01 ml,

respectivamente para o SAL e a mesma distribuição para o 2-ME. O fenol foi diluído em solução salina a 0,5% e o antígeno foi diluído a 1% na solução salina fenicada. Em seguida, foram transferidos 1 ml da solução salina para cada tubo e após 30 minutos foi adicionado 1 ml do antígeno para cada tubo. O 2-ME foi diluído em solução salina a uma concentração de 0,78% e pipetado 1 ml em cada tubo, contando 30 minutos de descanso e, em seguida, foi adicionado 1 ml do antígeno diluído em solução salina a 2%. Após 48 horas, foram realizadas as leituras, das provas com o teste controle positivo e negativo, e analisadas as precipitações com formação de grumos e classificados como reagentes de acordo com as diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

ELISA indireto (iELISA)

O Elisa indireto foi realizado segundo protocolo descrito por Putini et al (2008). A técnica apresenta sensibilidade de 77,8%, especificidade de 100%, e concordância de 89%. O ponto de corte é de 0,122 (densidade óptica). Abaixo se descreve o protocolo utilizado: O antígeno utilizado foi o mesmo que se utiliza para a prova de soroaglutinação lenta, com concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, inativada pelo calor, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Partida: 001/06 e data de fabricação: Fev/06. A padronização utilizada foi na diluição de 1:50. Realizou-se uma placa com as seguintes diluições, antígeno puro, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e observou-se que o melhor resultado encontrado foi 1:50 (FREY; DI CANZIO; ZURAKOWSKI, 1998). O protocolo foi padronizado no Laboratório de Doenças Infecciosas da Unime. Primeiramente o antígeno foi diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 para sensibilização da placa; com uma micropipeta acrescentou-se 100ml do antígeno em cada poço da placa com 96 poços colocada em câmara úmida, mantida “over night” à temperatura entre 4 a 8°C.

Depois de retirada da geladeira a placa foi lavada duas vezes com PBS-T e iniciou-se o bloqueio com leite desnatado a 5%, adicionado 200ml por poço da placa que foi levada dentro de uma câmara úmida para estufa a 37°C por duas horas. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada uma vez com PBS-T. Procedeu-se a diluição do soro na concentração de 1:10.000 seguindo o protocolo seguinte: foram colocados 45

tubos ependorf, devidamente identificados na galeria e, após diluição do leite desnatado a 1% em 50ml de PBS-T, foi transferida 1 ml dessa diluição para cada ependorf. Acrescentou-se em seguida 10ml de cada soro conforme mapa de identificação, num total de 45 amostras. Após essa operação foram retirados 50ml dessa diluição e colocados em duplicata em cada poço da placa que foi levada para a estufa a 37°C por 1 hora. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T e, em seguida, diluiu-se 10ml do conjugado anti-IgG caprino em 10ml de PBS-T em diluição 1:10.000, transferindo-se 50ml dela em cada poço da placa que foi levada para a estufa a 37°C por uma hora. Após isso, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T. Preparou-se a solução reveladora, na qual se diluiu 4ml de água oxigenada, 4mg de OPD (ortosenilenodiamino) em 10 ml de tampão citrato pH 5,1. Acrescentou-se, então, 50ml dessa diluição em cada poço da placa que foi guardada sem exposição da luz para revelação entre 15 e 20 minutos. Após esse tempo, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4N e realizou-se a leitura da placa em filtro de 490 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 230 amostras coletadas do laticínio A foram não reagentes no TAL. No Laticínio B das 240 amostras colhidas, 69 amostras foram reagentes (28,75%) no TAL sendo todas de apenas uma propriedade (Tabela 1). Esse teste é importante para se detectar rebanhos infectados, servindo também para monitorar rebanhos de propriedades que aderiram ao programa de propriedade livre de brucelose, mas pode apresentar resultados falsos positivos mediante a leites ácidos, ou que vieram de animais com mamite ou até mesmo animais em início de lactação (BRASIL, 2006). No estudo realizado a propriedade com amostras reagentes deve ser notificada para que realize outros testes preconizados pelo PNCEBT nos animais de forma individual (BRASIL, 2017). SILVA JÚNIOR et al (2007), concluiu com os resultados de estudo, que o teste do anel em leite, realizado com amostras de leite de latões, é uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica da brucelose bovina, indicada como método de diagnóstico presuntivo. Contudo, é fundamental realizar o diagnóstico sorológico individual nos programas de erradicação ou controle da enfermidade no rebanho. Ainda assim, apesar dos seus problemas, é considerado um

teste de triagem barato em conjunto com outros testes (POESTER et al, 2010).

Tabela 1 – Total de amostras reagentes e não reagentes ao TAL.

TAL	LATICÍNIO	
	A	B
Reagentes	00	69
Não reagentes	230	171
Total de amostras	230	240

No abatedouro, das 316 amostras coletadas, 10 foram reagentes no teste AAT (3,16%), (Tabela 2). Essas amostras foram provenientes de 28 propriedades, sendo 06 com amostras reagentes ao AAT (Tabela 3). As amostras reagentes foram testadas pelo SAL e 2-ME e o resultado foi obtido pela leitura da tabela de referência para animais vacinados na idade de 3 a 8 meses de idade e acima de 24 meses, conforme preconizado pelo PNCEBT.

Tabela 2 – Total de amostras reagentes e não reagentes ao teste de AAT.

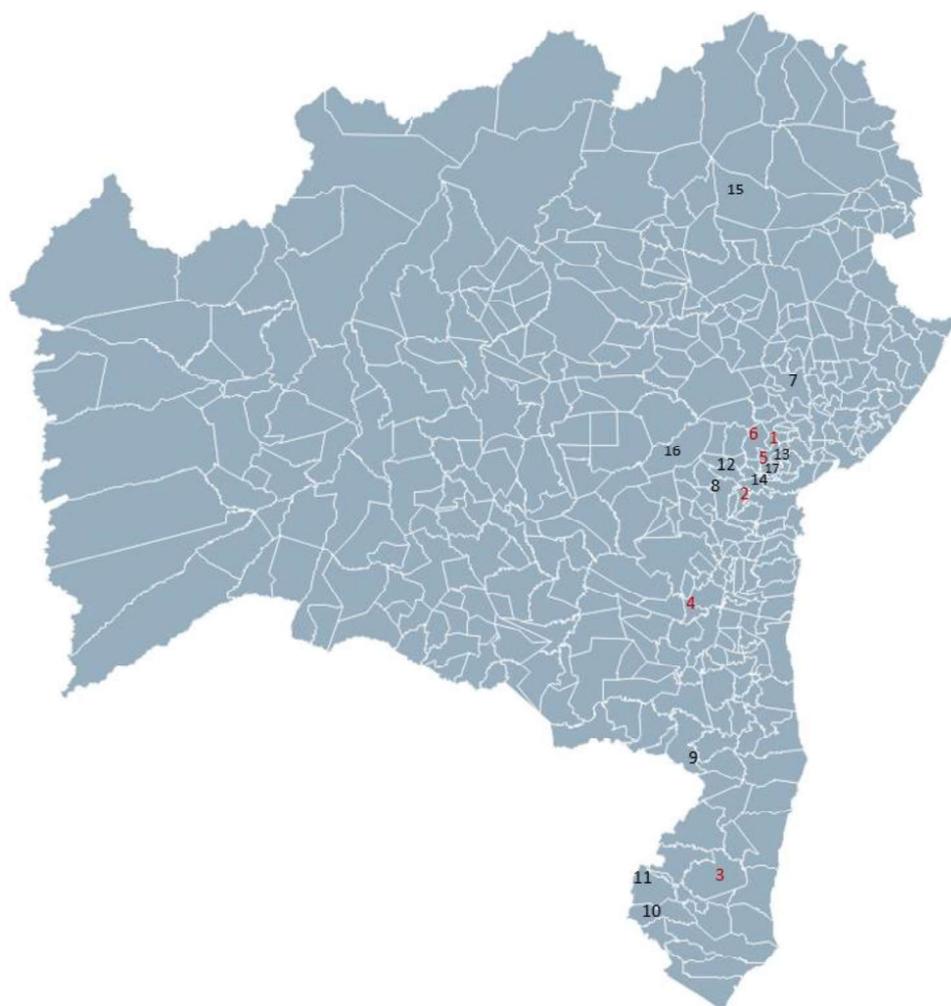
AAT	
Reagentes	10
Não reagentes	306
Total de amostras	316

Tabela 3 – Total de propriedades reagentes e não reagentes ao teste de AAT.

AAT	
Reagentes	06
Não reagentes	22
Total de Propriedades testadas	28

As 28 propriedades amostradas estão localizadas em 17 municípios (Figura 6). Os municípios com amostras reagentes ao AAT estão identificados de 1 a 6 com fonte vermelha.

Figura 6 – Municípios onde estão localizadas as propriedades amostradas no AAT.



1- Sapeaçu 2- Mutuípe 3- Itamaraju 4- Dario Meira 5- Conceição do Almeida 6- Castro Alves 7- Feira de Santana 8- Ubaíra 9- Itarantim 10- Medeiros Neto 11- Itanhém 12- Amargosa 13- Dom Macedo Costa 14- Laje 15- Monte Santo 16- Iaçú 17- Santo Antônio de Jesus.

Fonte: Adaptado de <http://solosne.cnps.embrapa.br/index.php?link=ba>

Duas amostras apresentaram titulação 1:25 e uma amostra apresentou titulação 1:50 no SAL. Essas três amostras não apresentaram nenhuma titulação no 2-ME, sendo

consideradas negativas. As outras sete amostras reagentes no AAT, foram confirmadas no SAL e 2-ME (Tabela 4), sendo que uma amostra apresentou titulação 1:200 no SAL e 1:200 no 2-ME, uma amostra apresentou titulação 1:200 no SAL e 1:100 no 2-ME, uma amostra apresentou titulação 1:50 no SAL e 1:50 incompleto no 2-ME, uma amostra apresentou titulação 1:100 no SAL e 1:50 no 2-ME, uma amostra apresentou titulação 1:100 no SAL e 1:100 no 2-ME, uma amostra apresentou titulação 1:50 no SAL e 1:25 no 2-ME e uma amostra apresentou titulação 1:25 no SAL e 1:25 no 2-ME. As três amostras reagentes ao AAT e negativas no 2-ME, mas reagentes no SAL podem ter apresentado tal reação devido ao predomínio de IgM nos soros, ou serem reações inespecíficas ou com anticorpos residuais de vacinação com a B19 (BRASIL, 2006).

Tabela 4 – Total de amostras com resultado positivo no SAL e 2-ME.

SAL/2-ME	
Positivas	07
Negativas	03
Total de amostras	10

Algumas reações falso-negativas ocorrem porque apesar da detecção preferencialmente da classe IgG nesta prova, isso limita a identificação (falso negativo) de animais no início de infecção e também porque algumas moléculas de IgG também são suscetíveis à redução das pontes dissulfeto, não podendo aglutinar, porém, em geral, a redução de IgM aumenta a especificidade (POESTER et al, 2010; BRASIL, 2006).

PAULIN et al (2009) diz que o AAT é um bom método de triagem, mas sugere que o mesmo deveria ser confirmado com testes qualitativos e com alto limite de detecção, não haja necessidade de titulação periódica dos reagentes utilizados e o não aja manipulação com substâncias tóxicas, como ocorre com os testes FC e 2-ME. A realização de mais de um teste para o diagnóstico conclusivo das amostras positivas em teste de triagem aumenta a especificidade dos procedimentos, pois diminui o número de falsos-positivos, dando uma maior confiabilidade ao estudo (JARDIM et al., 2009).

MEIRELLES-BARTOLI e MATHIAS (2010) comparando o AAT como prova de triagem e a combinação do SAL e 2-ME, concluíram que o diagnóstico sorológico da brucelose é mais confiável quando obtido por meio dos resultados de mais de um teste, uma vez que soro com título elevado em um teste pode apresentar resultado negativo em outro.

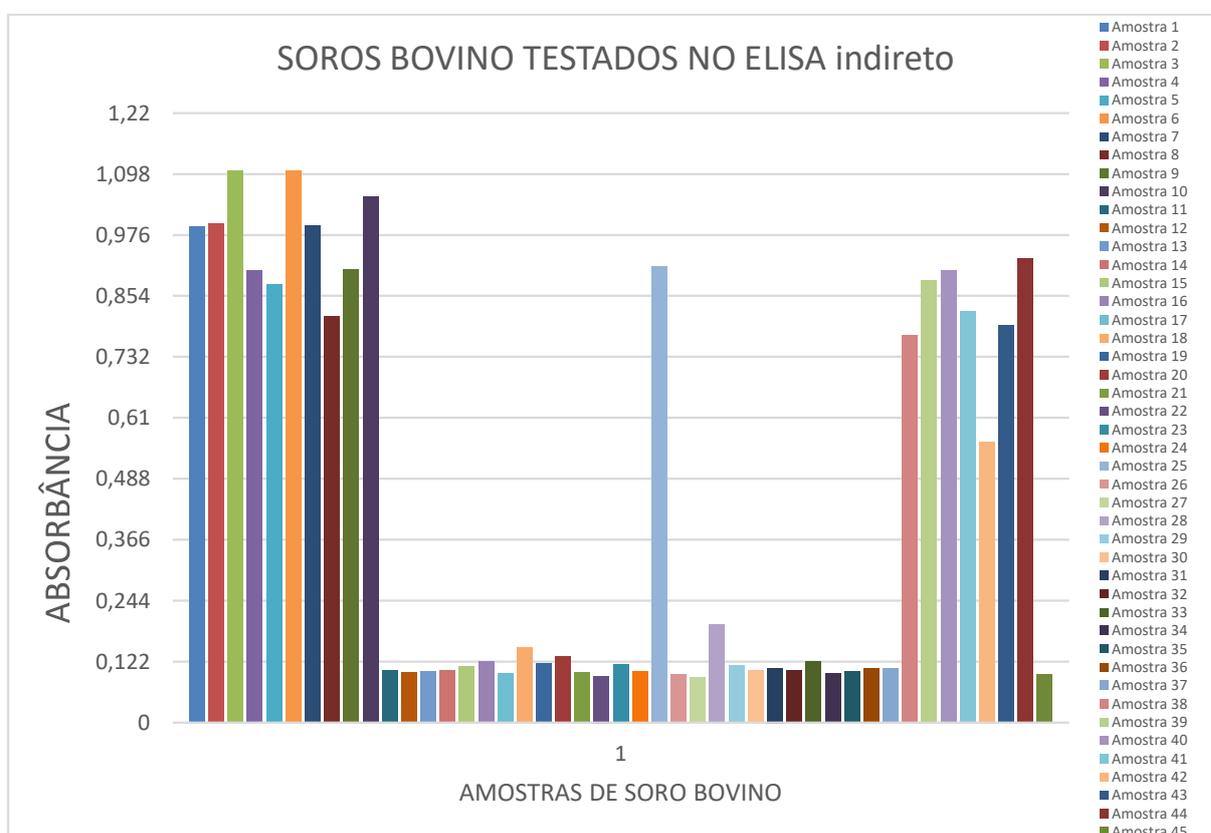
Das 316 amostras de soro analisadas 2,2% foram positivas. Das 28 propriedades testadas 17,8% teve pelo menos uma amostra positiva. Em um estudo realizado diretamente em propriedades, SILVA et al (2019) registrou 10,6% de amostras positivas e 60% de propriedades positivas em uma mesorregião do Acre. Sousa et al (2019) em estudo realizado em frigoríficos sob inspeção federal e municipal no Maranhão registrou uma prevalência de 1,19%, num total de 1.265 amostras de soro bovino.

As 10 amostras de soro reagentes no AAT e mais 35 amostras não reagentes foram testadas no iELISA com os resultados apresentados em gráfico (Figura 7). As amostras reagentes no AAT, foram identificadas com a numeração de 1 a 10, onde todas foram reagentes ao ELISA, inclusive as que deram negativas no teste do 2-ME que foram as amostras 1, 2 e 8. Além dessas, das 35 amostras não reagentes no AAT, 11 foram reagentes no iELISA, apresentando absorvância acima do valor de corte ("cut-off") 0,122.

Ressalta-se que tanto o AAT, como o iELISA são testes que apresentam alta sensibilidade e especificidade menor, o que pode ocorrer muitas reações falso positivas (BRASIL, 2006; PUTINI *et al.*, 2008). MATURINO *et al* (2022), em seu trabalho, constatou a baixa sensibilidade de AAT frente ao iELISA para ser considerada uma prova de triagem, considerando iELISA superior por poder detectar animais com titulação mais baixa. JARDIM *et al.* (2006), constatou em seu trabalho com a dose reduzida de vacina B19, que iELISA foi o único teste a ter sensibilidade de 100% frente aos outros testes sorológicos, sendo mais capaz de identificar os animais doentes. JARDIM *et al.* (2009) em um estudo que compara o iELISA no diagnóstico de brucelose em rebanhos vacinados e não vacinados sugere que seria necessário o uso de provas confirmatórias, devido a alta sensibilidade do teste, onde poderia se ter muitos falsos positivos devido a presença de imunoglobulinas residuais

da vacina B19. SIMPSON et al. (2018) em um estudo para avaliar a resposta imunológica da vacina B19 concluiu que o iELISA é equivalente ao AAT, quanto a sensibilidade e especificidade. O iELISA tem alta sensibilidade, mas uma especificidade mais baixa em regiões que praticam a vacinação com a B19, pois não distingue o anticorpo vacinal da infecção. Em áreas que não praticam a vacinação, a especificidade é alta (POESTER et al, 2010).

Figura 7 – Amostras de soro bovino testadas no Elisa indireto.

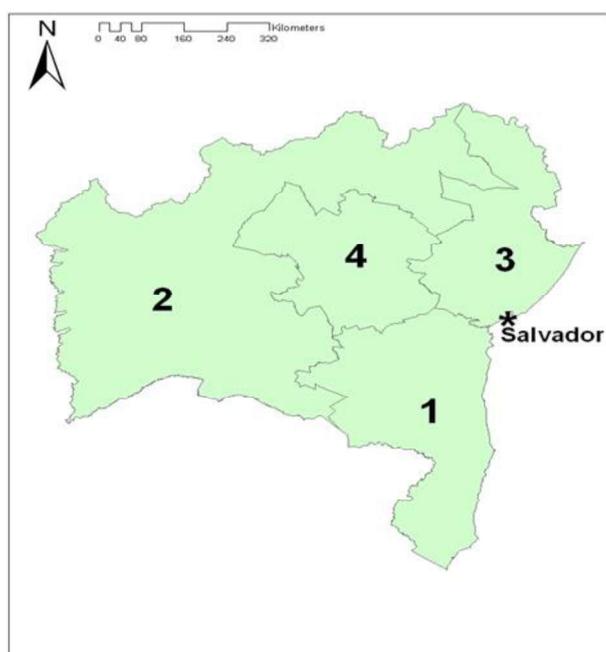


Fonte: Acervo próprio

O último levantamento soro epidemiológico da brucelose bovina na Bahia foi realizado em 2004, quando as prevalências de focos e a de fêmeas adultas soropositivas do Estado foram de 4,2% [3,1–5,3%] e 0,66% [0,41–0,93], respectivamente. O estado foi dividido em quatro regiões com características produtivas homogêneas. A região do Recôncavo da Bahia ficou situada na região 3 (Figura 8), onde as prevalências de

focos e a de fêmeas adultas soropositivas foram de 6,3% [4,0–9,3%] e 1,7% [0,66–2,7%] (ALVES et al., 2009). O estudo visa contribuir efetivamente para o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Estado. Espera-se fornecer subsídios para a tomada de decisões futuras dentro do Programa, apoiando no combate à doença no Estado por meio do uso desses sistemas de vigilância, além de oferecer um bom panorama sobre a situação da brucelose bovina na região estudada.

Figura 8 – Mapa da Bahia com a divisão em circuitos produtores: 1 (Sul); 2 (Noroeste); 3 (Nordeste); 4 (Centro).



Fonte: Adaptado de ALVES et al., 2009.

CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que após análise de amostras de leite através do Teste do Anel do Leite, um teste de triagem preconizado pelo o PNCEBT, uma propriedade foi detectada com a presença da doença, devendo o rebanho ser testado de forma individual com outras provas de caráter confirmatório. O estudo sugere também que animais foram reagentes para a brucelose após os soros de vacas destinadas ao

abate serem testados pela prova de triagem AAT, pela prova confirmatória 2-ME e pelo ELISA indireto. Todos os testes se mostraram como importante ferramenta para identificação da doença dentro do sistema de vigilância epidemiológica da brucelose bovina.

O teste do ELISA indireto apesar de não ser um teste oficial pode ser utilizado juntamente com o AAT como teste de triagem, por apresentar boas sensibilidade e especificidade, podendo detectar animais com titulação mais baixa. Os dois testes apresentaram falsos positivos, por isso a utilização da prova do 2-ME foi importante, aumentando a especificidade no diagnóstico, ratificando a necessidade do uso de testes confirmatórios evitando que animais não infectados sejam sacrificados.

AGRADECIMENTOS

Ao LFDA-MG (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária) por ceder os antígenos para a execução do trabalho e Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI-UFRB).

REFERÊNCIAS

ALVES, A.J.S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.6-13, 2009.

BAHIA. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura. Nota Técnica.2014. Disponível em: http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/not_notatecnicaiteite.pdf. Acesso em 10/09/2022.

BAHIA. Secretaria do Planejamento. Plano Territorial De Desenvolvimento Rural Sustentável E Solidário – Ptdrss do Recôncavo. 2017. Disponível em https://www.seplan.ba.gov.br/wp-content/uploads/PTDS_Territorio_Reconcavo.pdf. Acesso em 05/01/2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)** –. Brasília: Departamento de Defesa Animal, 2006. 132p. (Manual Técnico).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA n.10 de 03 de mar. de 2017. Brasília, DF, mar. 2017.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em 09/11/2020a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diagnóstico Situacional do PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília, DF, 2020b.

CALLEFE, J.L.R.; NETO. J.S.F. Sistemas de Vigilância em saúde animal. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020.

CUNHA, W. P.; DIAS, I. C. L.; MARTINS, D. F.; SILVA, M. I. S. Perfil de Produtores Rurais frente a zoonoses e medidas profiláticas de doenças em rebanhos bovinos. **Extensão Rural**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 93-108, 2012.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v.221, n.1-2, p.35-41, 1998.

JARDIM, G.C.et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus* . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.3, p.177-182, jul-set, 2006.

JARDIM, G.C. et al. Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 131-142, 2009.

MATURINO, M.P.M. et al. Levantamento sorológico de brucelose em bovinos monitorados no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.29, n.3, p.130-134, jul-set, 2022.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2015.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo pncebt para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, 2010.

PAULIN, L.M. et al. Avaliação entre quatro técnicas sorológicas da infecção por brucella abortus em bovinos. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.1, p.09-15, jan/mar. 2009.

POESTER , F.P.et al. Diagnóstico de brucelose. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.46-60, 2010.

PUTINI, V.B. et al. Padronização e avaliação da sensibilidade e especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno a cepa de *B. abortus* inativada. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v.6, n.3, p.361-370, 2008.

SANTOS, R. L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.6, p.759-764, jun.2013. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000600012. Acesso em 08 nov. 2022.

SIMPSON, G.J.G. Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**. Pretória, v.89, 2018. ISSN: 2224-9435.

SILVA JÚNIOR, F.F. et al. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, supl.2, 2007.

SILVA, T.I.B. et al. Análise dos fatores de risco para brucelose bovina em rebanhos leiteiros da microrregião de Rio Branco, Acre, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**.V.86, p.1-6, 2019.

SOUSA, A.K.A. et al. Brucelose bovina em frigoríficos com Serviços de Inspeção Federal e Municipal no estado do Maranhão. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.86 p.1-7, 2019

THE CENTER FOR FOOD SECURITY E PUBLIC HEALTH (CFSPH). Brucellosis: *Brucella abortus*, 2018. Disponível em https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_abortus.pdf. Acesso em 15 set. 2023.

UFLA. Rastreabilidade e Segurança Alimentar. **Boletim Técnico**, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. Lavras: UFLA, n. 91, 25p., 2012.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há de se ressaltar que após a realização desse estudo, podemos observar a necessidade da exigência de testes de triagem para as propriedades que enviam leite para os laticínios, visto que atualmente a legislação só exige a vacinação das bezerras, de 03 a 08 meses de idade com a B19. Na pecuária leiteira os produtores estão sempre renovando o seu rebanho e a entrada de novos animais sem a exigência de exames pode trazer para uma propriedade livre, a instalação da doença, o que pode ser minimizado com a detecção da infecção através do Teste do Anel do Leite, que seria realizado periodicamente pelo Serviço de Defesa Animal oficial. Deve se considerar também o uso do teste do AAT em bovinos machos reprodutores e fêmeas adultas com mais de 36 meses que adentrarem os abatedouros além do uso de EPIs específicos para os trabalhadores que venham impedir ou minimizar os riscos de infecção pela brucelose. Por ser uma zoonose que causa problemas graves nos acometidos, o custo para essas ações deve ser dividido entre o setor público e privado.

Mais estudos devem ser realizados sobre a brucelose bovina envolvendo não apenas os animais, mas também com as pessoas envolvidas principalmente na cadeia produtiva do leite. Um trabalho que deve ser realizado em conjunto entre o setor produtivo e o setor público, visto a importância dessa zoonose, além dos potenciais prejuízos econômicos e sociais trazidos pela doença. Outro importante trabalho a ser feito é a intensificação nas informações passadas ao público alvo sobre a doença, como palestras, distribuição de cartilhas e folders, além do uso de vídeos impactantes sobre as formas mais graves da doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Molecular e Celular*. 8 edição. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2015.

ALVES, A.J.S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.6-13, 2009.

ALVES JÚNIOR, J.A. **Brucelose Em Bovinos No Estado Da Paraíba (2006 – 2015)**. Areia, PB, 2017. 40p. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.

AZEVEDO, S. S.; et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.19-26, 2009.

ARENAS, G. N. et al. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* J774 macrophages. **Infection and Immunity**. Washington, v. 68, n. 7, p. 4255–4263, July 2000.

BAHIA. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura. Nota Técnica.2014. Disponível em: http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/not_notatecnica leite.pdf. Acesso em 10/09/2022.

BAHIA. Secretaria do Planejamento. Plano Territorial De Desenvolvimento Rural Sustentável E Solidário – Ptdrss do Recôncavo. 2017. Disponível em https://www.seplan.ba.gov.br/wp-content/uploads/PTDS_Territorio_Reconcavo.pdf. Acesso em 05/01/2024.

BALDWIN, C. L.; GOENKA, R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 26, n. 5, p. 407–442, 2006.

BILLARD, E.; DORNAND J.; GROSS, A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* Rough Strains with Human Dendritic Cells. **Infection and Immunity**. V.75, n. 12, p.5916-5923, 2007.

BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA. Brucelose e Tuberculose: Epidemiologia, controle e diagnóstico. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)** –. Brasília: Departamento de Defesa Animal, 2006. 132p. (Manual Técnico).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.** 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guiaboiso.pdf. Acesso em: 10 jul. 2023.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em 09/11/2020a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA n.10 de 03 de mar. de 2017. Brasília, DF, mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diagnóstico Situacional do PNCEBT: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Brasília, DF, 2020b.

CALLEFE, J.L.R.; NETO. J.S.F. Sistemas de Vigilância em saúde animal. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020.

CÁRDENAS, L.; AWADA, L.; TIZZANI, P.; CÁCERES, P.; CASAL, J. Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996-2014). **Transboundary and Emerging Diseases.** p. 1-11, 2019.

CIRL, C. et al. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. **Nature Medicine,** v.14, n.4, p.399-406, 2008.

CLEMENTINO, I.J.; AZEVEDO, S.S. Bovine brucellosis: epidemiological situation in Brazil and disease control initiatives. **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 37, n. 4, p. 2021- 2034, jul./ago. 2016.

CONCEIÇÃO, A.I. **Importância Da Brucelose Bovina Como Zoonose**. Garanhuns, PE, 2017. 52p. . Monografia (Residência veterinária em sanidade de ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Brucellosis in humans and animals. 2006.

CUNHA, W. P.; DIAS, I. C. L.; MARTINS, D. F.; SILVA, M. I. S. Perfil de Produtores Rurais frente a zoonoses e medidas profiláticas de doenças em rebanhos bovinos. **Extensão Rural**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 93-108, 2012.

DE CARVALHO, R.F. **Brucelose: frequência, georreferenciamento de focos, fatores de risco em rebanhos bovinos e em seres humanos envolvidos na cadeia produtiva do leite na região do Médio Mearim, Maranhão, Brasil**. 2014. 105f. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Animal). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, 2014.

DORNELES, E. M. S. et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**, Guildford, v. 33, n. 31, p. 3659–3666, July 2015.

FERREIRA NETO, J.S. Brucellosis and tuberculosis in cattle in South America. Review Article. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 55, n. 2, p. 1-23, 2018.

FERREIRA, R.R. **Diagnóstico e Avaliação Epidemiológica da Brucelose em Bovinos no Curimataú Paraibano**. Picuí, PB, 2019. 70p. Monografia (Especialização em Gestão de Recursos Ambientais) – Instituto Federal de Educação Tecnológica da Paraíba.

FRANCO, M.P. et al. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**. Londres, v.12, p.775-786, 2007. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70286-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70286-4).

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v.221, n.1-2, p.35-41, 1998.

GHANBARI, M.K.; GORJI, H.A.; BEHZADIFAR, M.; SANEE, N.; MEHEDI, N.; BRAGAZZI, N.L. One health approach to tackle brucellosis: a systematic review. **Tropical Medicine Health**. Oct 20; p. 48-86, 2020.

GERESU, M.A.; KASSA, G.M. A Review on Diagnostic Methods of Brucellosis. **Journal of Veterinary Science and Technology**. V.7, n.3, 2016.

GONÇALVES, V.S.P. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.35-45, 2009.

GREVE, I.C. et al. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes antígeno acidificado tamponado (aat) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. *Revista Acadêmica*. Curitiba, v.5, n.3, p.255-263, 2007.

HOMEM, V.S.F. et al. Brucelose bovina e humana na fronteira agrícola Transamazônica,Uruará, Pará, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.37, n.5, supl.2, p.3803-3808, 2016.

JARDIM, G.C.et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus* . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.3, p.177-182, jul-set, 2006.

JARDIM, G.C. et al. Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 131-142, 2009.

JIMENEZ DE BAGUES, M.P. et al. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. **Clinical Immunology**, v.114, p.227-238, 2004.

KALTUNGO, B.Y.; SAIDU, S.N.A.; MUSA, I.W.; BABA, A.Y. Brucellosis: A Neglected Zoonosis. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1551-1574, 2014.

KHALAF, O.H.; CHAKI, S.P.; GARCIA-GONZALEZ, D.G.; FICHT, T.A.; ARENAS-GAMBOA, A.M. The NOD-scid IL2r gamma(null) mouse model is suitable for the study of osteoarticular brucellosis and vaccine safety. **Infection and Immunity**. 87:e00901-18, 2019.

LAGE, A. P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, 2008.

LAPAQUE, N. *et al.* Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. **Cellular Microbiology**, v.8, n.2: 197-206, 2006.

LAWINSKY, M. L. DE J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 4, p. 75–84, 2010.

MATURINO, M.P.M. et al. Levantamento sorológico de brucelose em bovinos monitorados no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.29, n.3, p.130-134, jul-set, 2022.

MATHIAS, L.A. Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.70, n.2, p.47-48, 2008.

MEGID, J.; MATHIAS, L.A.; ROBLES, C.A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.119-126, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/266583383_Clinical_Manifestations_of_Brucellosis_in_Domestic_Animals_and_Humans. Acesso em 10 de novembro de 2020.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2015.

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo pncebt para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, 2010.

MONTEIRO, L.A.R.C et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.217-222, 2006.

MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. **Frontiers in Microbiology | Infectious Diseases**, v. 5, n. May, p. 1–18, 2014.

MUFINDA, F.C.; BOINAS, F.; NUNES, C. Prevalência e factores associados à brucelose humana em profissionais da pecuária. São Paulo, **Revista de Saúde Pública**. p.51 a 57, 2017.

NETA, A. V. C.; MOL, J. P.S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**. v.184, 146–155, 2010.

NIELSEN, K. et al. Comparação de testes sorológicos para detecção de anticorpos ovinos e caprinos para *Brucella melitensis*. **Revue Scientifique et Technique**, v.23, n.3, p.979-987, 2004.

OGATA, R.A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.126-134, 2009.

OLIVEIRA, F.F.M. **Sanidade Animal: Brucelose**. Relatório (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. Porto, 2012. 70 p.

OLIVEIRA, M. A. **Diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite bovino**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p.48-49, 2014.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N.; CHRISTOU, L.; TSIANOS, E.V. The new global map of human brucellosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.6, p.91-99, 2006.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J.S. **O combate à bruceloses bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal:FUNEP, 154 p., 2003.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo. V.70, n.2, p.239-249, abr/jun. 2003. Disponível em:
http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arg/V70_2/paulin.pdf. Acesso em 09/09/2022.

PAULIN, L.M.; **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, p.93, 2006.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. Brucelose em búfalos: Artigo de revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.75, n.3, p.389-401, 2008.

PAULIN, L.M. et al. Avaliação entre quatro técnicas sorológicas da infecção por brucella abortus em bovinos. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.1, p.09-15, jan/mar. 2009.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.47, p.13-29, 2005.

POESTER, F.P.et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl. 1, p.1-5, 2009.

POESTER , F.P.et al. Diagnóstico de brucelose. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.46-60, 2010.

PUTINI, V.B. et al. Padronização e avaliação da sensibilidade e especificidade de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno a cepa de *B. abortus* inativada. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v.6, n.3, p.361-370, 2008.

RADOSTITS, O.M. et al. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 11ª Edição. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2006.

ROCHA, W.V. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.27-34, 2009.

SALCEDO, S.P. et al. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. **PLoS Pathogens**, v.4, n.2, p. 1-16, 2008.

SANTOS, R. L.; MARTINS, T.M.; BORGES, A.M.; PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.6, p.759-764, jun.2013. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000600012. Acesso em 08 nov. 2022.

SIMPSON, G.J.G. Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**. Pretória, v.89, 2018. ISSN: 2224-9435.

SILVA JÚNIOR, F.F. et al. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.59, supl.2, 2007.

SILVA, V.G.S.O. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.119-117, 2009.

SILVA, T.I.B. et al. Análise dos fatores de risco para brucelose bovina em rebanhos leiteiros da microrregião de Rio Branco, Acre, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**.V.86, p.1-6, 2019.

SOUSA, A.K.A. et al. Brucelose bovina em frigoríficos com Serviços de Inspeção Federal e Municipal no estado do Maranhão. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.86 p.1-7, 2019.

SOUZA, V.M.M et al. Situação epidemiológica da Brucelose na Bahia, vigilância em matadouros e laticínios, com vistas ao controle e erradicação no Estado, 2016. ADAB – Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia.2016.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 9ª Edição. Filadélfia, PA: Saunders Elsevier, 2014.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY E PUBLIC HEALTH (CFSPH). Brucellosis: *Brucella abortus*, 2018. Disponível em https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_abortus.pdf. Acesso em 15 set. 2023.

UFLA. Rastreabilidade e Segurança Alimentar. **Boletim Técnico**, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. Lavras: UFLA, n. 91, 25p., 2012.

VILLAR, K.S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, supl.1, p.85-92, 2009.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Brucellosis (Infection With *Brucella Abortus*, *B . Melitensis* And *B . Suis*), 2022. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELOSIS.pdf. Acesso em 10 nov. 2022.

XAVIER, M.N. Pathogenesis of *Brucella spp.* **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.109-118, 2010.