

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**BRUCELOSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS
DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

MAURÍCIO GAUTERIO DASSO

PORTO ALEGRE, 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**BRUCELOSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS
DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

**Maurício Gauterio Dasso
Médico Veterinário**

**Dissertação apresentada como requisito ao grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Novembro, 2006**

AGRADECIMENTOS

Em especial à Professora Marisa da Costa, pela orientação, paciência, dedicação e conhecimento.

Aos membros da banca examinadora, Professores Amauri Braga Simonetti, Luís Gustavo Corbellini e Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

À direção e a todos os funcionários do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao colega Alexandre Braga pelo incentivo, colaboração e apoio para a conclusão desta etapa.

Ao colega e Professor Paulo Michel Roehe pelo incentivo e estímulo para a formação acadêmica.

Aos colegas, amigos e companheiros Alessandra e Paulo Esteves pelos ensinamentos, apoio e colaboração neste trabalho.

À colega e amiga Anna Paula Oliveira pela amizade e pelos conhecimentos adquiridos ao longo desta jornada.

Ao amigo, colega de profissão e professor Daniel Thompsen Passos pela ajuda, força e amizade.

Ao companheiro Diego Hepp pela sua colaboração.

Ao meu cunhado Pablo, pelo auxílio na formatação do trabalho.

À Olenka pelo carinho, paciência e ajuda nos momentos de dificuldade.

À minha família pela compreensão, amor e carinho, além do apoio nas horas mais complicadas.

BRUCELOSE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Maurício Gauterio Dasso

Orientadora: Prof^a Marisa da Costa

RESUMO

A Brucelose é uma zoonose de ampla distribuição que causa grandes perdas econômicas nas criações animais, bem como risco à saúde pública. Em bovinos leiteiros, as principais manifestações como abortos e baixa produção de leite, contribuem para uma queda na produção de alimentos, além da possibilidade de transmissão através do leite contaminado. Tendo em vista que o método mais preciso de diagnóstico da brucelose é a identificação do agente etiológico, o isolamento bacteriológico assume grande importância. Os objetivos do presente trabalho foram: identificar rebanhos leiteiros com brucelose no estado do Rio Grande do Sul utilizando técnicas imunológicas preconizadas pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose e isolar *Brucella* sp. dos rebanhos positivos nestes testes. Foram analisadas 476 amostras de soro bovino através do Teste do Antígeno Acidificado Tamponado, sendo detectadas 137 amostras reagentes. Estas foram submetidas à Prova do 2-Mercaptoetanol, na qual foram confirmadas 117 amostras. Foram analisadas 205 amostras de leite através do Teste do Anel em Leite e do isolamento bacteriológico onde foram detectadas 48 positivas e obteve-se 15 isolados de *Brucella* sp. Os 15 isolados foram caracterizados e confirmados através da Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gênero *Brucella* (gene *BCSP31* e *IS6501/711*). A brucelose ainda faz parte do contexto sanitário de muitas propriedades do Rio Grande do Sul. Além das perdas sanitárias e econômicas, destaca-se a importância do leite na transmissão desta enfermidade para o homem.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (81p). Novembro, 2006.

BOVINE BRUCELLOSIS IN DAIRY CATTLE OF THE STATE OF THE RIO GRANDE DO SUL

Author: Maurício Gauterio Dasso

Advisor: Prof. Marisa da Costa

ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis of large distribution that cause great economic losses in the animal farms, as well as risk to the public health. In dairy cattles, the main clinical signs such as abortions and low milk yield, contribute for a reduction in the food production, besides the possibility of transmission through contaminated milk. The most precise method for diagnostic of brucellosis is the identification of the etiologic agent so the bacteriological isolation assumes great importance. The aim of the present work was to identify the positive animals using serologic tests recommended by the National Program of Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis and to isolate *Brucella* sp. from dairy cattle of different regions the state of the Rio Grande do Sul. Four hundred and seventy six samples of bovine serum were also analyzed by the Buffered Antigen Plate Agglutination Test and 2-Mercaptoetanol Test, with 137 reacting samples. Two hundred and five milk samples from dairy cattle were submitted to the Milk Ring Test and 48 were positive. The 205 milk samples were also analyzed by through bacteriological isolation and *Brucella* sp. was isolated in 15 samples. These isolates were characterized and confirmed by through the Polymerase Chain Reaction, using specific primers for the genus *Brucella* (gene *BCSP31* and *IS6501/711*). Brucellosis still is part of the sanitary context in many farms of our state. Besides the sanitary and economic losses, importance of milk in the transmission of this disease to humans must be emphasized.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (81p). November, 2006.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Brucelose animal	3
2.2. Relação com o homem.....	4
2.3. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.....	7
2.4. <i>Brucella</i> sp.....	10
2.4.1. Morfologia.....	10
2.4.2. Diagnóstico.....	11
2.4.2.1. Métodos Indiretos	11
2.4.2.1.1. Resposta imune celular	12
2.4.2.1.2. Resposta imune humoral	12
2.4.2.1.2.1. Testes Imunológicos.....	15
2.4.2.1.2.1.1. Teste do Antígeno Acidificado Tamponado	15
2.4.2.1.2.1.2 Teste do 2-Mercaptoetanol	17
2.4.2.2.1.3 Teste do Anel em Leite.....	19
2.4.2.2. Métodos Diretos	22
2.4.2.2.1. Métodos Bacteriológicos	22
2.4.2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Amostras de soro	29
3.2. Amostras de leite.....	30
3.3. Diagnóstico Imunológico	32
3.3.1. Antígenos	32
3.3.2. Testes Imunológicos.....	32
3.3.2.1. Teste do Antígeno Acidificado Tamponado.....	32
3.3.2.2. Teste do 2-Mercaptoetanol.....	33
3.3.2.3. Teste do Anel em Leite.....	35
3.4. Análise estatística	35
3.5. Diagnóstico Bacteriológico	35
3.5.1. Isolamento.....	35
3.5.2. Caracterização bioquímica dos isolados	36
3.5.3. Confirmação molecular dos isolados.....	36
3.5.3.1. Condições de amplificação	37
3.5.3.2. Análise dos produtos amplificados	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Diagnóstico Imunológico	39
4.1.1. Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e Teste do 2-Mercaptoetanol	39

4.1.2. Teste do Anel em Leite.....	44
4.2. Diagnóstico Bacteriológico	47
4.2.1. Isolamento de <i>Brucella</i> sp.	47
4.2.2. Confirmação molecular dos isolados.....	58
4.2.2.1. Gene <i>BCSP31</i>	58
4.2.2.2. Gene <i>IS6501 / 711</i>	59
5. CONCLUSÕES	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Diferenciação de biovares das espécies do gênero <i>Brucella</i>	25
TABELA 2: Distribuição do número de amostras de soro recebidas e analisadas por município. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	30
TABELA 3: Distribuição do número de amostras de leite recebidas e analisadas por município. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	31
TABELA 4: Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade.....	34
TABELA 5: Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos, com idade superior a oito meses	34
TABELA 6: Distribuição dos resultados de animais reagentes nos testes sorológicos do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), conforme o município. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	40
TABELA 7: Distribuição dos resultados positivos obtidos nos testes sorológicos (Teste do Anel em Leite – TAL, Antígeno Acidificado Tamponado – AAT e Mercaptoetanol –2-ME), conforme a propriedade e o município. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	45
TABELA 8: Distribuição dos resultados obtidos no isolamento bacteriológico, conforme a propriedade e o município. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006.....	49
TABELA 9: Resultados dos testes bioquímicos das amostras de <i>Brucella</i> sp. isoladas a partir do leite. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	51
TABELA 10: Comparação da sensibilidade a corantes (tionina e fucsina), penicilina e a necessidade da presença de CO ₂ das amostras de <i>Brucella</i> isoladas a partir do leite. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006	52
TABELA 11: Comparação dos títulos obtidos (2-ME) com os resultados dos outros testes imunológicos (AAT e TAL) e do isolamento bacteriológico nas 42 amostras positivas no teste do 2-ME. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006.	54
TABELA 12: Comparação dos resultados obtidos no isolamento bacteriológico, com o Teste do Anel em Leite (TAL), com o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e com o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) em 205 amostras de leite e soro das mesmas vacas. Rio Grande do Sul. Brasil. 2006.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – amostra negativa e positiva	33
FIGURA 2: Teste do 2-Mercaptoetanol – amostras negativas e positivas	34
FIGURA 3: Teste do Anel em Leite – amostra negativa e positiva	35
FIGURA 4: Mapa do RS, mostrando a distribuição de animais reagentes positivos nos testes sorológicos (AAT e 2-ME)	44
FIGURA 5: Mapa do RS, mostrando a distribuição de animais reagentes positivos no isolamento bacteriológico	50
FIGURA 6: PCR para confirmação dos isolados de <i>Brucella</i> sp., utilizando o par de oligonucleotídeos Bruc 887 e Bruc 1457	58
FIGURA 7: PCR para confirmação dos isolados de <i>Brucella</i> sp., utilizando o par de oligonucleotídeos IS3 e IS4.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	2-Mercaptoetanol
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μg	Microgramas
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B19	Amostra vacinal (cepa lisa) de <i>Brucella abortus</i>
BCSP31	Proteína antigênica do lipopolissacarídeo de <i>Brucella abortus</i>
D.O.	Densidade Ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para a Agricultura e Alimentação)
FC	Fixação de Complemento
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FPA	<i>Fluorescence Polarization Assay</i> (Teste de Polarização Fluorescente)
G	unidade de aceleração gravitacional (9,80665 m/s ²)
g	Grama
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
Ig	Imunoglobulina
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
IS	<i>Sequence insertion</i> (Seqüência de Inserção)
KDa	KiloDaltons
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
OIE	Organização Internacional de Epizootias
<i>omp</i>	<i>outer membran protein</i> (proteína da membrana externa)
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial de Hidrogênio
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
RB51	Amostra vacinal (cepa rugosa de <i>Brucella abortus</i>)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo no comprimento do fragmento digerido)
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por Minuto
SAA	Secretaria da Agricultura e do Abastecimento
SAL	Soroaglutinação lenta
SALT	Soroaglutinação lenta em tubos
SAR	Soroaglutinação rápida

SARP	Soroaglutinação rápida em placa
TAL	Teste do Anel em Leite
TBE	Tris-base EDTA (tampão de corrida para eletroforese)
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultra-Violeta
<i>WboA</i>	Gene que codifica a proteína glicosiltransferase

1. INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma zoonose de distribuição mundial que causa grandes perdas econômicas nas criações animais, bem como risco considerável à saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a incidência de brucelose humana no mundo está estimada em, aproximadamente, 500.000 casos a cada ano. A doença afeta, além do homem, diversas espécies animais como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e caninos. As principais manifestações nos animais, como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite, contribuem para uma considerável queda na produção de alimentos. Em bovinos leiteiros, a brucelose assume grande importância em função das inúmeras perdas sanitárias e econômicas causadas, assim como pela possibilidade de transmissão pela ingestão do leite contaminado.

No Brasil, foi instituído o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas duas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária Nacional. A brucelose atinge tanto gado de corte como o gado de leite, sendo a tuberculose um problema mais sério para os produtores de leite. Tendo em vista que a brucelose bovina é uma

doença endêmica em todo o território nacional, a vacinação obrigatória das terneiras e o diagnóstico sorológico assumem fundamental importância para o sucesso do PNCEBT.

Sabendo que o método mais preciso e inequívoco de diagnóstico da brucelose é a identificação do agente etiológico (diagnóstico direto), o isolamento bacteriológico e a detecção do microrganismo através de técnicas que envolvem a biologia molecular, podem apresentar grande relevância. Os materiais mais utilizados para o isolamento do agente são: leite, exsudato vaginal, sangue, membranas fetais, fetos abortados e linfonodos. Neste sentido, o isolamento de *Brucella* em amostras de leite e a posterior identificação presuntiva da espécie e biovar, apresentam grande importância sob o ponto de vista epidemiológico da brucelose.

A presença do agente no leite de vacas provenientes de rebanhos leiteiros distribuídos pelo estado do Rio Grande do Sul demonstra também uma questão de saúde pública, tendo em vista o grande potencial zoonótico da doença.

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a presença de brucelose em rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul. Os objetivos específicos foram identificar animais com brucelose utilizando testes imunológicos e confirmar a excreção de *Brucella* sp. através do leite.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Brucelose animal

A brucelose animal é uma doença principalmente de fêmeas adultas em gestação. Fêmeas não gestantes e animais jovens são também suscetíveis, porém em menor grau. A doença pode difundir-se rapidamente, produzindo perdas acentuadas por abortos, nascimentos prematuros e esterilidade, variando de 50 a 100% (Samartino & Enright, 1993). Desta forma, rebanhos infectados podem sofrer consideráveis perdas econômicas devido à baixa fertilidade, bem como queda na produção de leite e carne (Poester *et al.*, 2002).

De todos os agentes infecciosos envolvidos em doenças da reprodução em bovinos, *Neospora caninum*, *Leptospira spp.* e *Brucella spp.* são os principais microrganismos causadores de abortos em vacas de leite e de corte (Campero *et al.*, 2003; Corbellini *et al.*, 2006). *Brucella abortus* é o principal agente responsável pela brucelose bovina. Esta doença acomete rebanhos bovinos em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (Hornitzky & Searson, 1986; Sutra & Dubray, 1987; Salgado *et al.*, 1995; Poester *et al.*, 2002; la Orden, 2003; Poletto *et al.*, 2004; Tenório *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2005; Arimi *et al.*, 2005).

A brucelose bovina está disseminada por todo o território nacional, porém, a sua prevalência e distribuição regional não estão bem caracterizadas. No Rio Grande do Sul, a prevalência de animais soropositivos foi reduzida de 2,0% em 1975 para 0,3% em 1986, principalmente em função de um programa de vacinação amplamente difundido naquele período (Poester *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2003; Brasil, 2005). Em 2005, foi realizado novo inquérito sorológico no estado, onde se encontrou uma prevalência de 1,01% de animais infectados, considerando somente as fêmeas com idade acima de 24 meses (dados ainda não publicados). Foram analisadas 17.528 amostras, provenientes de 2.054 propriedades, distribuídas entre gado de corte e gado de leite, abrangendo cerca de 490 municípios do Rio Grande do Sul. Em 2,17% das propriedades testadas havia pelo menos um animal positivo, demonstrando que a brucelose bovina ainda está presente em nosso estado (dados ainda não publicados). Além disso, é possível constatar que a prevalência da brucelose aumentou em relação ao levantamento sorológico realizado em 1986, tendo em vista a ausência de vacinação em muitas propriedades e a falta de um manejo sanitário.

2.2 Relação com o homem

É uma doença de caráter ocupacional ocorrendo principalmente com magarefes, funcionários de abatedouros, processadores de carne, trabalhadores agrícolas, veterinários e técnicos de laboratório (Lacerda *et al.*, 2000; Acha *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2001; Rodriguez-Valin *et al.*, 2001; Villamarín-Vázquez *et al.*, 2002).

O consumo de leite cru e derivados não pasteurizados é uma das principais formas de transmissão para a população e esta prática de alto risco ainda é muito comum no país, especialmente nas populações de áreas rurais. O isolamento de *Brucella* do leite e derivados, como queijos e sorvetes, é ainda freqüente em vários países, incluindo o Brasil (Langoni *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2002; Kuplulu & Sarimehmetoglu, 2004; Arimi *et al.*, 2005).

A sobrevivência da bactéria no leite e produtos lácteos depende da atividade da água, temperatura, pH e presença de outros microrganismos. Em queijos moles, com elevada atividade de água, a *Brucella* sp. pode ser conservada por vários dias (Nascimento *et al.*, 2002). A pasteurização é um método eficiente de destruição da *Brucella* sp., assim como as radiações ionizantes. Em produtos não pasteurizados elas podem persistir durante vários meses, demonstrando a potencialidade dos produtos derivados do leite como fontes de infecção (Plommet *et al.*, 1988).

Inúmeros trabalhos têm descrito as diversas formas de apresentação da brucelose em vários países (Ghosh *et al.*, 1999; Santos-Neto *et al.* 1999; Kochar *et al.*, 2000; Yagupsky & Peled, 2002; Peled & Yagupsky, 2004; Al Dahouk *et al.*, 2005; Benslimani, *et al.*, 2005). A manifestação clínica da doença no homem é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho, sendo que os principais sintomas são: anorexia, mialgia, alucinações, dores de cabeça, dores articulares e febre (Acha *et al.*, 2001; Fiori *et al.*, 2000; Vrioni *et al.*, 2004). Também são relatadas complicações osteoarticulares, linfadenites e orquiepididimites (Alapont Alacreu *et al.*, 2004; López Rodríguez *et al.*, 2005). O número de homens infectados, geralmente, supera o de

mulheres (2:1). Esta maior incidência da brucelose no sexo masculino deve-se, provavelmente, ao grupo de risco analisado (Lacerda *et al.*, 2000; Vrioni *et al.*, 2004). Vários trabalhos sugerem que a infecção tenha sido adquirida a partir do consumo do leite cru, de vacas, cabras e ovelhas (Méndez Martínez *et al.*, 2003).

Além da ingestão, a infecção pode ocorrer por contato, inalação e inoculação acidental. Vários casos humanos ocorrem pelo contato com materiais infectados como abortos, restos placentários, urina, fezes e carcaças animais. Recentemente, alguns casos graves de neurobrucelose e granulomas intracerebrais têm sido associados ao contato com mamíferos marinhos (Sohn *et al.*, 2003). A inoculação acidental é bastante comum entre veterinários e vacinadores (Nicoletti *et al.*, 1986). Em alguns casos pode ocorrer a formação de abscessos no local da inoculação, com multiplicação bacteriana e reação inflamatória. A partir do conteúdo destes abscessos, torna-se possível o isolamento e a caracterização do agente (comunicação pessoal). Tendo em vista que a vacina contra a brucelose bovina é uma vacina viva atenuada, esta deve ser controlada e aplicada por pessoal capacitado.

Locais onde se trabalha com elevadas populações dessa bactéria, como por exemplo, laboratórios que produzem vacinas e/ou antígenos para o diagnóstico, devem dispor de um controle rigoroso em relação à biossegurança, pois são considerados fontes de infecção em potenciais (Yagupsky & Baron, 2005). Podem ocorrer acidentes em laboratórios provocados pela negligência e descuido dos técnicos em relação às normas de biossegurança, especialmente naqueles laboratórios que realizam o isolamento

bacteriológico de *Brucella* sp., causando a infecção, muitas vezes sob a forma de surtos, envolvendo várias pessoas (Martin-Mazuelos *et al.*, 1994; Brew *et al.*, 1999; Fiori *et al.*, 2000; Wallach *et al.*, 2004).

No Brasil, Santos-Neto *et al.* (1999) relataram um caso de abscesso esplênico causado por *Brucella abortus* em um jovem com história profissional de trabalho em fazenda, com aplicação de vacinas e manejo do gado. Em 2002, Ferreira *et al.* diagnosticaram um caso de espondilodiscite brucelósica em uma mulher proveniente do meio rural do estado da Paraíba. Em Pernambuco, dois casos foram relatados: um vaqueiro que contaminou-se no exercício de suas atividades profissionais e um diplomata americano que adquiriu a doença através da ingestão de queijo coalho cru (Magalhães & Lima, 1997).

2.3 Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

Em 11 de janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu o PNCEBT com o objetivo de diminuir o impacto negativo dessas duas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional (Brasil, 2005).

Os objetivos específicos do programa são:

- baixar a prevalência e a incidência de novos focos de brucelose e tuberculose;
- criar um número significativo de propriedades certificadas como livres ou monitoradas para brucelose e tuberculose, que ofereçam ao consumidor

produtos de baixo risco sanitário.

A estratégia deste programa consiste em um conjunto de medidas sanitárias compulsórias associadas, entretanto, a ações de adesão voluntária.

As medidas compulsórias têm eficácia comprovada e permitem obter uma importante redução da prevalência e da incidência das duas doenças a custos reduzidos. Trata-se da vacinação das terneiras contra a brucelose e do controle do trânsito de animais destinados à reprodução. É importante ressaltar que a prioridade neste Programa é a vacinação contra a brucelose. Todas as fêmeas bovinas e bubalinas, entre 3 e 8 meses de idade, devem ser vacinadas. É realizada somente uma aplicação da vacina contra a brucelose, capaz de conferir imunidade sólida e duradoura. A vacina oficial do PNCEBT é a B19, que é uma amostra atenuada utilizada em fêmeas jovens, apresenta boa indução de imunidade celular, porém, pelas características da cepa, pode causar interferência no diagnóstico sorológico, pois induz a formação de anticorpos. Por essa razão os testes sorológicos só devem ser realizados após os 24 meses em animais que foram vacinados.

As ações de adesão voluntária dizem respeito à certificação de propriedades livres e de propriedades monitoradas, que nada mais são do que um instrumento que os produtores e o setor agroindustrial utilizarão para agregar valor aos seus produtos.

Para garantir a qualidade técnica das ações do programa, foi elaborada uma série de medidas que visam:

- capacitar médicos veterinários e laboratórios, tanto oficiais como privados;

- padronizar os métodos de diagnóstico utilizados;
- permitir as ações de fiscalização e monitoramento que cabem ao serviço oficial de defesa sanitária animal;
- melhorar a integração desse serviço de defesa sanitária com o serviço oficial de inspeção de produtos de origem animal.

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes:

- teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT);
- teste do Anel em Leite (TAL);
- teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME);
- teste de Fixação de Complemento (FC).

O teste do AAT e o TAL são considerados testes de triagem enquanto que os testes do 2-ME e a FC são confirmatórios no diagnóstico da brucelose.

O Laboratório de Brucelose do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) está diretamente envolvido no PNCEBT, sendo classificado como laboratório oficial credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No IPVDF são realizados testes de diagnóstico direto e indireto da brucelose, produção de antígenos e vacinas, bem como a capacitação de médicos veterinários que irão atuar no Programa. Neste sentido, o presente trabalho assume grande importância pela identificação de animais e propriedades positivas para a brucelose em rebanhos leiteiros do RS, reduzindo progressivamente o número de focos da doença e, com isso, contribuindo para o controle da brucelose.

2.4 *Brucella* sp.

2.4.1 Morfologia

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, imóveis, não possuem cápsula e medem de 0,5 a 0,7 μm de diâmetro por 0,6 a 1,5 μm de comprimento. Seis espécies, classificadas com base nas provas bioquímicas, sorológicas, fagotipagem, diferenças de patogenicidade e preferência por hospedeiros, são reconhecidas dentro do gênero *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Algumas espécies apresentam diferenças que as subdividem em grupos fenotípicos denominados biovares. Sendo assim, a espécie *Brucella abortus* está composta por sete biovares, a *Brucella melitensis* por três biovares e a *Brucella suis* por cinco biovares. A *Brucella ovis*, a *Brucella canis* e a *Brucella neotomae* não apresentam biovares, sendo representadas somente pela amostra de referência (Corbel & Brinley Morgan, 1984; Alton *et al.*, 1988; Acha *et al.*, 2001).

Através da análise do polimorfismo do DNA de *Brucella* sp. isoladas de mamíferos marinhos e, de acordo com os hospedeiros preferenciais, Cloeckaert *et al.* (2001) sugeriram o nome de duas novas espécies para o gênero *Brucella*: *Brucella pinnipediae* (para isolados de pinepídeos) e *Brucella cetaceae* (para isolados de cetáceos) (Foster *et al.*, 2002; Cloeckaert *et al.* 2003).

Geneticamente, todas as espécies do gênero *Brucella* são similares

e apresentam o genoma distribuído em 2 cromossomos circulares. O genoma de *B. melitensis*, *B. suis* e de *B. abortus* já foram completamente seqüenciados e apresentam tamanho aproximado de $3,30 \times 10^6$ pb (DeVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005).

A diferenciação entre as espécies de *Brucella* e seus diferentes biovars está baseada na sorotipagem, fagotipagem, sensibilidade a corantes, requerimento de CO₂, produção de H₂S e propriedades metabólicas (Alton *et al.*, 1988). Entretanto, a instabilidade descrita de algumas destas características fenotípicas pode, algumas vezes, dificultar a identificação de isolados em particular (Alton *et al.*, 1988). Desta forma a identificação de marcadores estáveis baseados no DNA está sendo considerada de grande utilidade na detecção e identificação de *Brucella* (Bricker *et al.*, 2002).

2.4.2 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado pela detecção da resposta imunológica contra determinados antígenos da bactéria, métodos indiretos, ou pela identificação do agente, métodos diretos.

2.4.2.1 Métodos Indiretos

Os métodos indiretos podem ser considerados os métodos mais úteis para o diagnóstico da brucelose, tendo em vista a facilidade de execução e interpretação, a rapidez na obtenção dos resultados, o baixo custo e a padronização da maioria dos testes (Brasil, 2005).

2.4.2.1.1 Resposta imune celular

Tendo em vista que a *Brucella* caracteriza-se por ser um patógeno intracelular, a resposta imune celular assume grande importância na imunidade contra brucelose (Baldwin, 2002). A resposta imune celular do tipo 1 ou células Th1 (linfócitos T) são responsáveis pela produção da citocina interferon-gama, que é o principal ativador de macrófagos. Sabe-se que os macrófagos exercem um papel fundamental na realização da fagocitose, primeira etapa da resposta imune celular. Esta sensibilização de linfócitos T e macrófagos após a inoculação intradérmica de um antígeno protéico pode ter aplicação prática, que no caso da brucelose, é popularmente conhecida como teste da brucelina. Tendo em vista a baixa sensibilidade do teste, a necessidade de padronização e “pureza” do antígeno e a possibilidade de interferência em testes sorológicos subsequentes, este não é muito utilizado (Sutherland, 1983; OIE, 2000).

Desta forma, a resposta imune do tipo humoral, que também possui importância na imunidade da brucelose, é a mais utilizada através da detecção de anticorpos, especialmente em amostras de soro ou leite.

2.4.2.1.2 Resposta imune humoral

O método indireto de diagnóstico da brucelose, no qual se pesquisam anticorpos, é certamente o mais utilizado pela simplicidade de execução e interpretação. A detecção de anticorpos específicos de *Brucella* em amostras de soro sanguíneo e lácteo é bastante difundida através de inúmeros testes de diagnóstico (Diaz & Blasco, 1986; Nielsen, 2002).

Segundo Beh (1974), as principais classes de imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo bovino são IgG (IgG₁ e IgG₂) e IgM. A distribuição entre estas classes de imunoglobulinas e o tempo necessário para a detecção das mesmas está associada a diversos fatores, como o estágio da doença e a vacinação. IgM é a primeira imunoglobulina detectada nos testes sorológicos, sendo imediatamente seguida pela IgG₁ e, posteriormente, por pequenas quantidades de IgG₂ e IgA. Na maioria das reações cruzadas resultantes da exposição a outros microrganismos, a principal imunoglobulina envolvida é a IgM (Nielsen, 2004).

A presença do polissacarídeo O (OPS) presente na superfície celular da *Brucella* sp., representa a porção mais imunogênica. Devido a epítomos comuns presentes em *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*, a maioria dos testes sorológicos para detecção de anticorpos, utiliza antígenos de *Brucella abortus* (OIE, 2000).

No soro lácteo, as imunoglobulinas predominantes são representadas pelas classes IgA, IgM e IgG₁. Diferentemente das outras espécies de mamíferos domésticos, o leite bovino possui uma menor quantidade de IgA quando comparado a outras espécies. Embora a quantidade de IgA solúvel no soro lácteo bovino seja bastante reduzida, Honkanen-Buzalski & Sandholm (1981) demonstraram que esta quantidade pode ser até 16 vezes superior quando analisado o leite e a sua gordura, tendo em vista a intensa associação que ocorre entre esta imunoglobulina e a membrana dos glóbulos de gordura presente no leite. Sendo assim, a IgA assume grande

importância na detecção de anticorpos em amostras de leite (Sutra *et al.*, 1986).

A escolha dos métodos sorológicos a serem empregados, seja individualmente ou em programas de controle e erradicação, irá depender de vários fatores. Entre eles estão a espécie animal, a população sob vigilância, as taxas de prevalência e incidência e a aplicação de vacinas vivas (Heck *et al.*, 1986).

A maioria dos testes sorológicos não apresenta uma sensibilidade e especificidade absolutas devendo-se, normalmente, associar várias técnicas para aumentar o nível de detecção. Um teste sorológico perfeito deveria detectar infecção nos estágios iniciais da doença (antes da ocorrência do aborto), deveria diferenciar anticorpos de vacinação e de infecção, e ainda, não deveria apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas (Brasil, 2005). Até o presente momento, um teste com estas características ainda não está disponível.

Os testes sorológicos que utilizam antígenos de parede celular estão sujeitos a reações cruzadas com antígenos de outros microrganismos, que podem estar presentes na microbiota ou infectando o animal. Entre estes microrganismos, podemos citar: *Yersinia enterocolitica* sorovar O:9, *Escherichia coli* sorogrupo O:116 e O:157, *Francisella tularensis*, *Sterotrophomonas maltophilia* (anteriormente *Pseudomonas maltophilia*), *Salmonella urbana* e *Vibrio cholerae* (Alton *et al.*, 1988; Mainar-Jaime *et al.*, 2005; Megid *et al.*, 2000). A grande similaridade encontrada na cadeia O, região imunodominante da molécula do LPS de vários microrganismos, é

responsável pela maioria das reações inespecíficas nos testes sorológicos. Nielsen *et al.* (2004) demonstrou que a ocorrência de reações cruzadas entre *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157 e *Brucella abortus* depende muito do teste utilizado. Os testes de ELISA e de Polarização Fluorescente são os testes que apresentam maior sensibilidade e especificidade comparados aos testes de soroaglutinação e precipitação (Nielsen, 2002).

2.4.2.1.2.1 Testes Imunológicos

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel em Leite (TAL) como testes de triagem, 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC) como testes confirmatórios. Tendo em vista que o AAT, o TAL e o 2-ME foram os testes utilizados para o diagnóstico imunológico da brucelose neste trabalho, estes serão abordados e discutidos.

2.4.2.1.2.1.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado

O teste do AAT é o teste de rotina adotado pelo PNCEBT para o diagnóstico da brucelose bovina. O antígeno consiste de uma suspensão celular inativada de *Brucella abortus* cepa 1119-3, corada com rosa bengala, diluída a 8,0% em uma solução tamponada e acidificada, cujo pH deve ser 3,65 (Centro Panamericano de Zoonoses, 1982). É um teste de soroaglutinação rápida em placa, onde a acidez do pH do antígeno tende a prevenir algumas aglutinações com as imunoglobulinas da classe IgM, reduzindo as interações inespecíficas. Este é considerado um teste adequado de triagem, tendo em

vista a sua rapidez e praticidade na execução (Hunter & Allen, 1972; Serra & Viñas, 2004). Atualmente, o teste do AAT tem substituído a prova de soroprecipitação rápida em placa (SAR) que utiliza o antígeno de Huddleson, devido à ocorrência de reações falso-positivas e falso-negativas possibilitando, por um lado, a permanência de animais positivos no rebanho, e por outro a eliminação de animais falso-positivos quando utilizada isoladamente (Megid *et al.*, 2000; Molnár *et al.*, 2002; Brasil, 2005). Anticorpos resultantes da vacinação com a cepa B19 de *Brucella abortus* e anticorpos resultantes de algumas reações cruzadas são detectados pelo teste do AAT, sendo necessário nestes casos, a utilização de outros testes para confirmar animais reagentes como infectados (Mathias *et al.*, 2001; Nielsen, 2002).

A sensibilidade e a especificidade de cada teste dependem do critério adotado para determinar estes índices. Valores mais baixos são encontrados quando a comparação é feita com outros testes sorológicos. Valores mais altos são obtidos quando soros de animais infectados experimentalmente são adotados como parâmetro (Nielsen, 2002). Molnár *et al.* (2002) compararam seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina e encontraram uma sensibilidade de 91,42% e uma especificidade de 94,00% para o teste do AAT quando comparado com o ELISA de competição, teste recomendado pela FAO/OIE.

O teste do AAT, que é amplamente utilizado como prova de triagem para o diagnóstico da brucelose bovina, também vem sendo aplicado com sucesso no diagnóstico da brucelose humana. Além de ser um teste barato e

prático, tem demonstrado reduzir as reações inespecíficas detectadas por outras provas sorológicas (Lucero & Bolpe, 1998).

2.4.2.1.2.1.2 Teste do 2-Mercaptoetanol

O teste do 2-ME é um teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAT) onde existe o acréscimo de um agente redutor, o 2-Mercaptoetanol. Este reagente químico possui a função de degradar as ligações da imunoglobulina IgM, pela ação dos radicais tiol, determinando assim a perda de sua atividade aglutinante. Desta forma o teste detecta as aglutininas da classe IgG, o que torna a reação antígeno-anticorpo bem mais específica, diminuindo sensivelmente a possibilidade de reações falso-positivas, às quais são decorrentes principalmente pela IgM (Nielsen, 2002; Brasil, 2005). Esta diferenciação é importante, à medida que as aglutininas IgG são consideradas um melhor indicador de infecção ativa, do que as da classe IgM. Os títulos de IgM e IgG encontrados na SAT e no 2-ME são bastante úteis para avaliar a fase de infecção (Young, 1991).

O antígeno utilizado na prova de soroaglutinação lenta em tubos consiste de uma suspensão celular inativada de *Brucella abortus* cepa 1119-3, não corada, diluída a 6,0% em uma solução tamponada, cujo pH deve estar em torno de 7,0 (Centro Panamericano de Zoonoses, 1969).

O 2-ME é considerado uma prova confirmatória para o diagnóstico da brucelose, portanto, somente aquelas amostras que apresentarem reação positiva no AAT, devem ser submetidas à prova do 2-Mercaptoetanol (Brasil, 2005; Centro Panamericano de Zoonoses, 1968 e 1982). Neste sentido, a

associação de testes em série, sendo um deles simples, rápido e barato, como o AAT e o outro, um teste confirmatório e específico como o 2-ME, pode propiciar um aumento significativo da especificidade e, com isso, diminuir o número de falso-positivos. Somente aqueles animais positivos nos dois testes são considerados infectados. A utilização de testes em série é muito utilizada em situações de baixa prevalência e em programas de erradicação, quando se pratica sacrifício de animais (Brasil, 2005; Mainar-Jaime *et al.*, 2005).

O teste do Mercaptoetanol apresenta a capacidade de não reagir com anticorpos vacinais quando comparado com o teste de soroaglutinação lenta e com o AAT, especialmente quando este é realizado após os 24 meses (Poester *et al.*, 1978; Brasil, 2005).

Megid *et al.* (2000) demonstrou uma alta concordância nos resultados encontrados entre a prova do 2-ME e a prova do AAT. A prova do 2-ME pode ser considerada uma prova complementar específica, sendo sugerida a sua utilização em substituição à prova de fixação de complemento, também pela sua simplicidade de execução.

Em certas ocasiões, particularmente em títulos sorológicos altos, pode ocorrer o chamado fenômeno de zona ou pró-zona, onde a reação antígeno-anticorpo é inibida devido à alta quantidade de anticorpos presentes na amostra que cobrem cada molécula de antígeno, impedindo assim as ligações cruzadas que formam uma “malha” e a conseqüente precipitação (Centro Panamericano de Zoonoses, 1968; Rice & Boyes, 1971).

Os testes de soroaglutinação lenta com ou sem a presença do agente redutor, podem apresentar falhas em detectar animais infectados.

Animais recentemente infectados ou na fase crônica da doença podem não ser identificados pelo SAL, tendo em vista que o mesmo necessita de uma maior quantidade de aglutininas quando comparado com outros testes sorológicos (Poester, 1975; Nielsen, 2002).

Embora algumas técnicas sorológicas, como ELISA, pareçam ser mais sensíveis que os testes de aglutinação, o SAL é um teste simples, confiável e reprodutível (Young, 1991).

2.4.2.1.2.1.3 Teste do Anel em Leite

O teste do Anel em Leite (TAL) detecta a presença de anticorpos no leite, usando uma suspensão de brucelas coradas. É considerado um teste de triagem para o diagnóstico da brucelose e foi desenvolvido para testar amostras de leite de mistura ou individuais. O antígeno consiste de uma suspensão celular inativada de *Brucella abortus* cepa 1119-3, corada com hematoxilina, que fornece a coloração azul característica da reação positiva. Apresenta uma concentração celular de 4%, o que propicia a detecção de anticorpos presentes na amostra de leite (Centro Panamericano de Zoonosis, 1982). Tendo em vista que o TAL pode conduzir a interpretações erradas causadas pelas variações na condição do leite, tais como mastite, colostro e a fase final do ciclo de lactação, ele é recomendado pela OIE como um teste de triagem para o diagnóstico da brucelose bovina (Chielle *et al.*, 1989; OIE, 2000; Ponsano *et al.*, 2001).

A presença de IgA assume grande importância na detecção de amostras positivas no Teste do Anel em Leite. IgA é a principal imunoglobulina

presente no leite, podendo ser encontrada livre no soro lácteo, ou, como é mais freqüentemente, associada aos glóbulos de gordura. IgM e IgG também são encontrados no leite, porém em menor quantidade (Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981; Sutra *et al.*, 1986).

Os anticorpos presentes na amostra de leite reagem com o antígeno corado formando um complexo que se adere à superfície dos glóbulos de gordura do leite pela fração Fc da imunoglobulina e que, devido à baixa densidade, sobe formando um anel de creme corado em azul. Na ausência de anticorpos específicos, o anel formado será branco e a coluna de leite estará corada pelas células de *Brucella* contidas na composição do antígeno (Patterson *et al.*, 1974; Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981; Diaz & Blasco, 1986; Sutra *et al.*, 1986).

Entre os fatores que afetam o TAL destaca-se o efeito do estágio da lactação, o método de conservação ou estocagem das amostras de leite e a diluição de amostras de leite positivas (Roepke *et al.*, 1974; Patterson & Deyoe, 1976; Blythman & Forman, 1977; Silva Júnior *et al.*, 2004).

As principais vantagens do TAL são: a praticidade, a simplicidade, o baixo custo, a segurança e a versatilidade, podendo ser utilizado como teste individual ou coletivo (Roepke *et al.*, 1958; Roepke & Stiles, 1970; Acypreste *et al.*, 2002).

O TAL apresenta uma correlação positiva com os testes de soroaglutinação em tubos (Nicoletti & Burch, 1969). Ferguson & Robertson (1954) encontraram um índice de 93% de concordância entre os dois testes

quando analisaram 438 animais. Neste mesmo trabalho, os autores isolaram *Brucella* em mais de 10% das amostras positivas no TAL.

Analisando a eficiência do TAL em áreas que eram consideradas livres de brucelose, Janney *et al.* (1958), isolaram *Brucella* em 58% de animais reagentes no TAL. De um total de 3615 rebanhos testados, o TAL falhou em identificar somente um rebanho positivo. Neste mesmo trabalho, o TAL deixou de identificar 19 animais reagentes no teste de soroaglutinação em placa, dentre os quais três apresentavam infecção no úbere com excreção de *Brucella* no leite.

Quando comparado às provas sorológicas clássicas (Soroaglutinação, Prova do Rosa de Bengala e Fixação do Complemento) o TAL pode apresentar discordâncias por falsos negativos ou falsos positivos, detectando cerca de 73 a 85% dos rebanhos infectados. E também, quando aplicado como teste individual, pode ser considerado um eficaz complemento das provas regulamentares de diagnóstico (Roepke *et al.*, 1974; Sutra & Dubray, 1987).

Diaz & Blasco (1986), consideram que, através do TAL é possível identificar 88% dos rebanhos onde existam animais infectados e que a sensibilidade do teste está intimamente relacionada com o número de animais infectados e a quantidade de leite empregada na prova. Estes autores não recomendam o teste do Anel em Leite como técnica de diagnóstico individual, tendo em vista que existem animais infectados que são negativos no TAL.

Acypreste *et al.* (2002) comparou o teste do Anel em Leite com o teste do Rosa de Bengala ao verificar a frequência de brucelose bovina em

vacas em lactação, na bacia leiteira de Goiânia. Foram analisadas 106 amostras de leite de mistura e 870 amostras de soro sangüíneo, onde se detectou 5,66% de amostras positivas no TAL e 1,74% no Rosa de Bengala. Ao analisar as propriedades testadas, os autores encontraram 11,11% de propriedades reagentes no TAL e 17,78% no Rosa de Bengala. Neste trabalho, foi encontrada uma concordância de 80% entre as duas provas de diagnóstico utilizadas.

2.4.2.2 Métodos Diretos

2.4.2.2.1 Métodos Bacteriológicos

O isolamento e a identificação do agente etiológico é um método inequívoco de diagnóstico da brucelose. É relativamente sensível quando realizado em laboratórios capacitados e com experiência. Entretanto, em função do risco de contaminação no processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam este exame. Pode apresentar a desvantagem de se tratar de um processo trabalhoso e lento (Lepe *et al.*, 2001).

Pode-se isolar este microrganismo a partir do sangue, envoltórios fetais, placentas, fetos abortados, conteúdo estomacal dos fetos, exsudatos vaginais, sêmen, linfonodos e do leite de animais infectados (Alton *et al.*, 1988). A excreção de *Brucella abortus* no leite de vacas experimentalmente infectadas foi comprovada por Brinley Morgan & McDiarmid (1960). Neste experimento, os autores demonstraram que a *Brucella* é excretada de forma intermitente no leite, podendo apresentar uma grande variação individual (2 a 84%). Na

segunda lactação após os animais terem sido infectados, 9 entre 10 vacas examinadas continuavam eliminando *Brucella* no leite, demonstrando que a brucelose pode evoluir para uma doença crônica e ser transmitida para outros animais, inclusive o homem.

O meio de cultura indicado para o isolamento de amostras lisas de *Brucella* sp. é o meio seletivo de Farrel (1974), que visa inibir o crescimento de microrganismos contaminantes e favorecer o crescimento da bactéria em questão. A seletividade deste meio é devido à utilização de antibacterianos e antifúngicos, cuja composição pode variar segundo alguns autores (Alton *et al.*, 1988; Marín *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2002; Stack *et al.*, 2002).

Após o isolamento e a identificação de uma bactéria como pertencente ao gênero *Brucella*, deve-se realizar provas bioquímicas para a caracterização da espécie e do biovar, tendo em vista a grande importância que isto representa sob o ponto de vista epidemiológico. Entretanto, devido às dificuldades na identificação da espécie e do biovar, somente os laboratórios de referência realizam este trabalho. Segundo Alton *et al.* (1988), as provas bioquímicas preconizadas para a identificação de *Brucella* são: catalase, oxidase, urease, redução de nitratos e a produção de ácido sulfídrico (H₂S). O requerimento de CO₂ para o crescimento, a morfologia colonial, o hospedeiro preferencial, bem como a sensibilidade a corantes, a fagotipagem e a aglutinação com soros monoespecíficos complementam a caracterização deste microrganismo.

O biovar tipo 1 de *Brucella abortus* é o mais freqüentemente isolado em bovinos no mundo inteiro (OIE, 2000). No Brasil já foram isolados os

biovars tipo 1, 2 e 3 de *Brucella abortus*, *Brucella suis* biovar 1, *Brucella canis* e *Brucella ovis* (Poester *et al.*, 2002). Até o presente momento, ainda não foi isolada *Brucella melitensis* no país. Tendo em vista que esta espécie já foi isolada em países vizinhos como a Argentina, a Bolívia e o Peru, não se pode descartar a possibilidade da presença deste agente em nosso país (Gotuzzo *et al.*, 1987; Wallach *et al.*, 1994).

Na Turquia, Dokuzoğuz *et al.* (2005) conseguiram isolar *Brucella* em 54 culturas de sangue de um total de 243 amostras (22%) de pacientes com diagnóstico de brucelose aguda, no período compreendido entre janeiro de 1996 e maio de 2002. Neste trabalho, 83% dos isolados foram identificados como *Brucella melitensis* e 17% como *Brucella abortus*. Analisando o quadro clínico dos pacientes infectados comprovou-se que a infecção por *Brucella abortus* é menos severa do que a causada por *Brucella melitensis*.

O tempo de incubação necessário para o isolamento de *Brucella* em amostras biológicas é bastante variável, desde 72 horas após a semeadura, até o período de quatro semanas (Alton *et al.*, 1988; Lepe *et al.*, 2001).

O sucesso do isolamento bacteriológico depende dos cuidados na coleta, no processamento e na conservação das amostras, bem como do número de bactérias presentes na amostra e do número de amostras coletadas de um mesmo animal (Hornitzky & Searson, 1986). Tecidos provenientes de abortos como a placenta e o feto abortado, podem conter mais de 10^{13} bactérias por grama, enquanto que os linfonodos, o leite e o sangue de animais infectados apresentam uma dose infectante mais baixa e, sendo assim, o

isolamento torna-se mais difícil (Alexander *et al.*, 1981; Alton *et al.*, 1988; Lepe *et al.*, 2001).

Na Tabela 1 pode-se observar a classificação do gênero *Brucella* em espécies e biovars.

TABELA 1: Diferenciação de biovars das espécies do gênero *Brucella*.

Espécies	Biovar	Requerimento CO ₂	Produção H ₂ S*	Crescimento em corantes		Aglutinação em soro monoespecífico		
				Tionina 20µg/mL	Fucsina 20µg/mL	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+ou-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	-	-	-	+
<i>B. canis</i>		-	-	+	-	-	-	+

Fonte: Alton *et al.*, 1988

* = Papel filtro com acetato de chumbo; + = resultado positivo; - = resultado negativo.

A = soro anti-*Brucella abortus*; M = soro anti-*Brucella melitensis*; R = soro anti-amostra rugosa.

Em nosso país existe uma carência de trabalhos analisando a presença de *Brucella* no leite. Em um destes raros trabalhos, Langoni *et al.* (2000), isolaram *Brucella* spp. em 15 amostras de leite de vacas soropositivas para brucelose em São Paulo e Minas Gerais. A identificação da espécie e do biovar foi realizada conforme provas bioquímicas específicas e o crescimento na presença de corantes. As 15 amostras foram identificadas como *Brucella abortus* sendo uma classificada como biovar 1, oito como biovar 2 e seis como biovar 3.

2.4.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Os testes de diagnóstico direto têm sido aplicados de forma crescente para o diagnóstico de agentes infecciosos na medicina humana e veterinária. A reação em cadeia da polimerase (PCR), em particular, tem sido utilizada com sucesso para este objetivo. A PCR é rápida quando comparada com o isolamento bacteriológico e alguns testes sorológicos, tendo sido utilizada pela sua rapidez, sensibilidade e segurança (Bricker, 2002).

É uma técnica muito sensível e específica, mas requer certos equipamentos e pessoal capacitado para sua realização. Eventualmente, alguns dos oligonucleotídeos utilizados na PCR amplificam, sob algumas condições, bactérias muito próximas geneticamente das *Brucella* sp., como por exemplo o *Ochrobactrum antropi* e o *Phyllobacterium* sp. (De Ley *et al.*, 1987; Romero *et al.*, 1995; Da Costa *et al.*, 1996; Casañas *et al.*, 2001).

A técnica da reação em cadeia da polimerase tem sido pesquisada nestes últimos anos para a identificação e detecção das *Brucella* spp. em

diferentes tipos de materiais biológicos de várias espécies animais (Fekete *et al.*, 1990; Hermam & De Hidder, 1992; Bricker & Halling, 1994; Romero *et al.*, 1995 e 1999; Leal-Klevezas *et al.*, 1995 e 2000; Rijpens *et al.*, 1996; Da Costa *et al.*, 1996; Matar *et al.*, 1996; Romero & Lopez-Goñi, 1999; Tantillo *et al.*, 2001; Bricker, 2002a e b; Hamdy & Amin, 2002; Navarro *et al.*, 2002; Baek *et al.*, 2003; Bricker *et al.*, 2003; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005).

Alguns genes ou determinadas seqüências de nucleotídeos já foram utilizados na identificação de *Brucella* por hibridização e/ou PCR. O primeiro teste de PCR para a detecção de *Brucella* foi desenvolvido por Fekete *et al.*, (1990), utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir do gene que codifica uma proteína de membrana de 43 kDa de *Brucella abortus* cepa19.

O gene *BCSP31* que codifica uma proteína de 31 kDa foi utilizado para a detecção de *Brucella melitensis* e *Brucella abortus* através da PCR (Baily *et al.*, 1992; Matar *et al.*, 1996; Morata *et al.*, 1999 e 2001; Casañas *et al.*, 2001; Tantillo *et al.*, 2001; Vrioni *et al.*, 2004).

Herman & De Ridder (1992) e Romero *et al.* (1995) utilizaram oligonucleotídeos específicos do gene 16S rRNA de *Brucella abortus* para demonstrar a especificidade, sensibilidade e rapidez da técnica de PCR para identificação de *Brucela* spp.

Leal-Klevezas *et al.* (1995 e 2000), desenharam oligonucleotídeos a partir do gene *omp2*, que codifica uma proteína de membrana de 36 kDa, e comprovaram a sensibilidade da PCR comparada às provas sorológicas e bacteriológicas comumente utilizadas.

A diferenciação de amostras vacinais de cepas virulentas provenientes de isolados de campo tem sido realizada através da análise do polimorfismo do gene *omp2* (Cloekaert *et al.*, 1995; Brew *et al.*, 1999; Bardenstein *et al.*, 2002).

O gene *wboA* também tem sido estudado pela sua importância, já que o mesmo codifica a glicosiltransferase, uma enzima essencial para a síntese do antígeno “O” (Vemulapalli *et al.*, 1999).

A seqüência de inserção *IS6501*, descrita por Ouahrani *et al.* (1993), e também por Halling *et al.* (1993), que a denominou de *IS711*, vem sendo utilizada na caracterização e identificação das espécies de *Brucella* (Bricker & Halling, 1994; Hamdy & Amin, 2002; Baek *et al.*, 2003; Bricker *et al.*, 2003). Todas as espécies do gênero *Brucella* apresentam várias cópias desta seqüência de inserção, que possui 842 pares de base (Ouahrani-Bettache *et al.*, 1996).

Desta forma a identificação de marcadores específicos baseados no DNA pode ser considerada de grande utilidade no diagnóstico da brucelose, bem como na detecção específica de *Brucella*. Os experimentos realizados com a técnica de PCR para detecção do gênero *Brucella*, têm demonstrado grande especificidade quanto ao gênero, não sendo ainda possível realizar a diferenciação entre as espécies e os biovares utilizando apenas um gene ou uma única técnica molecular (Da Costa *et al.*, 1996; Cloekaert *et al.*, 2003; Ocampo-Sosa *et al.*, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram coletadas de abril de 2004 a abril de 2006.

3.1 Amostras de soro

Foram analisadas 476 amostras de soro de vacas, provenientes de rebanhos leiteiros de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul. A amostragem foi estabelecida pela chegada casual de soros ao laboratório para o diagnóstico da brucelose.

Com exceção das propriedades do município de Bagé, Sentinela do Sul e de uma propriedade de Eldorado do Sul, nas outras propriedades não era realizada a vacinação dos animais contra a brucelose. Cada amostra, contendo aproximadamente 5 a 10 mL de sangue, foi coletada pelo veterinário responsável da propriedade de maneira asséptica, utilizando tubos com vácuo e sem anticoagulante, com agulhas individuais e descartáveis. Depois de ocorrer a coagulação sangüínea, cada tubo foi centrifugado a fim de propiciar a retração do coágulo e a retirada do soro para um novo tubo. Após a obtenção do soro, cada amostra era refrigerada até a realização dos testes sorológicos (Poester, 1984; Alton *et al.*, 1988).

Na Tabela 2 pode-se observar a procedência e a distribuição das amostras de soro analisadas neste trabalho.

TABELA 2: Distribuição do número de amostras de soro recebidas e analisadas por município. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Município	Nº de propriedades	Nº de amostras
Bagé*	1*	28
Bom Jesus	1	3
Cidreira	1	2
Dom Pedrito	2	6
Eldorado do Sul*	3*	25
Erechim	1	4
Estância Velha	1	136
Frederico Westphalen	1	81
Gravataí	2	5
Ijuí	2	10
Nova Bassano	1	24
Protásio Alves	1	9
Sananduva	1	9
São Francisco de Paula	1	2
Sentinela do Sul*	1*	9
Três Palmeiras	1	7
Viamão	3	114
Vila Maria	1	2
Total	25	476

*Propriedades que adotavam a vacinação contra a brucelose (Bagé, Sentinela do Sul e 1 propriedade de Eldorado do Sul).

3.2 Amostras de leite

Foram analisadas 205 amostras de leite de vacas, provenientes de rebanhos leiteiros de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul, que apresentaram testes sorológicos positivos para brucelose, bem como casos de aborto e/ou infertilidade e, também, amostras de rebanhos livres de brucelose

(Tabela 3). Estes rebanhos eram considerados livres de brucelose pois realizavam a vacinação das terneiras contra a brucelose, bem como testes sorológicos periódicos para o diagnóstico, e mantinham assistência veterinária. Dentre os animais positivos nos testes sorológicos, foram coletadas amostras de leite daquelas propriedades que consentiram com a coleta.

TABELA 3: Distribuição do número de amostras de leite recebidas e analisadas por município. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Município	Nº de propriedades	Nº de amostras
Bagé*	1	28
Bom Jesus	1	3
Cidreira	1	2
Dom Pedrito	2	6
Eldorado do Sul*	3	25
Erechim	1	4
Estância Velha	1	86
Frederico Westphalen	1	10
Gravataí	2	5
Ijuí	2	10
Nova Bassano	1	11
Sentinela do Sul*	1	9
Viamão	2	4
Vila Maria	1	2
Total	20	205

*rebanhos livres de brucelose (Bagé, Sentinela do Sul e 1 propriedade de Eldorado do Sul).

Cada amostra continha uma mistura de leite retirado dos quatro tetos (aproximadamente 20 mL no total), tendo em vista que a infecção pode localizar-se em um ou mais quartos da glândula mamária. O leite foi coletado

pelo veterinário responsável, de modo asséptico, após terem sido desprezados os primeiros jatos (Alton *et al.*, 1988; Poester, 1984). As amostras não receberam nenhum tipo de tratamento (conservante) e foram mantidas sob refrigeração até a execução dos testes (teste do anel em leite e isolamento bacteriológico).

3.3 Diagnóstico Imunológico

3.3.1 Antígenos

Todos os antígenos utilizados foram produzidos pelo Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e pelo Instituto de Tecnologia do Paraná, sendo testados e aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em todos os testes imunológicos eram utilizadas simultaneamente amostras de soros ou leites controle positivo e negativo.

3.3.2 Testes Imunológicos

3.3.2.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado

O teste foi realizado em 476 amostras de soro. De cada amostra eram retirados 30 μL , aos quais era adicionada igual quantidade de antígeno e misturados durante 4 minutos para a realização da leitura final (Brasil, 2005). Foram consideradas negativas aquelas amostras onde houve ausência de grumos. Foram consideradas positivas aquelas amostras onde houve presença de grumos (Figura 1).

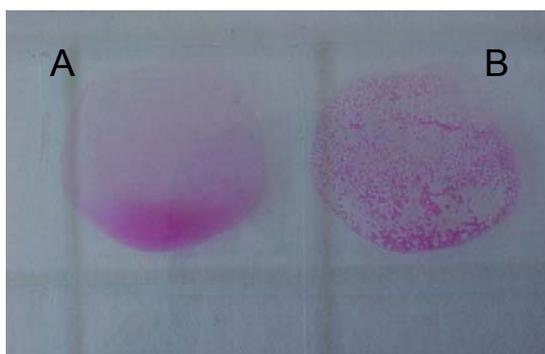


FIGURA 1: Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – amostra negativa (A) e positiva (B).

3.3.2.2 Teste do 2-Mercaptoetanol

As amostras que apresentaram reação positiva no teste do AAT, foram submetidas ao teste do 2-Mercaptoetanol. A prova do 2-ME consiste na realização de duas provas de soroaglutinação lenta em tubos (SALT), sendo uma com adição do reagente, 2-Mercaptoetanol, e outra sem. De cada amostra de soro eram retiradas alíquotas e distribuídas em 8 tubos, dispostos dois a dois. As quantidades dispensadas nos tubos pareados eram 10, 20, 40 e 80 μ L. Após a distribuição do soro, era adicionado o reagente 2-Mercaptoetanol em uma das séries de tubos e na outra já era adicionado o antígeno, diluído em uma solução salina fenicada. Depois de 20 minutos do soro incubado com o agente redutor, acrescentava-se o antígeno que estava diluído em uma solução salina, misturava-se bem e incubavam-se as duas séries de tubos a 37°C durante 48 horas (Centro Panamericano de Zoonosis, 1968 e 1982; Brasil, 2005). A diluição final nos tubos era 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Foram consideradas negativas aquelas amostras em que a mistura soro-antígeno permaneceu turva, e uma leve agitação não revelou a presença de grumos. Foram consideradas positivas aquelas amostras em que o líquido da mistura

soro-antígeno tornou-se translúcido e a leve agitação não rompeu os grumos formados (Figura 2).

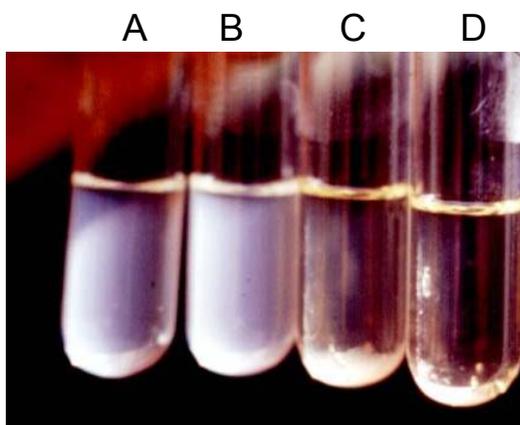


FIGURA 2: Teste do 2-Mercaptoetanol – amostras negativas (A e B) e positivas (C e D).

A interpretação do teste do 2-ME está apresentada nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4: Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre três e oito meses de idade.

Teste de soroaglutinação lenta (UI/ml)	Teste do 2-ME (UI/ml)	Interpretação
≤50	<25	Negativo
≥100	<25	Inconclusivo
≥25	≥25	Positivo

Fonte: PNCEBT; UI - Unidade Internacional.

TABELA 5: Interpretação do teste do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos, com idade superior a oito meses.

Teste de soroaglutinação lenta (UI/ml)	Teste do 2-ME (UI/ml)	Interpretação
≤25	<25	Negativo
≥50	<25	Inconclusivo
≥25	≥25	Positivo

Fonte: PNCEBT; UI - Unidade Internacional.

3.3.2.3 Teste do Anel em Leite

O teste foi realizado em 205 amostras de leite. De cada amostra era retirado 1 mL, após agitação, ao qual era adicionado 30 μ L de antígeno, homogeneizado e incubado a 37°C durante 1 hora (Brasil, 2005). Foram consideradas negativas aquelas amostras onde o anel de creme permaneceu branco e a coluna de leite ficou azul. Foram consideradas positivas aquelas amostras onde o anel de creme tornou-se azul e a coluna de leite ficou branca ou levemente azulada (Figura 3).

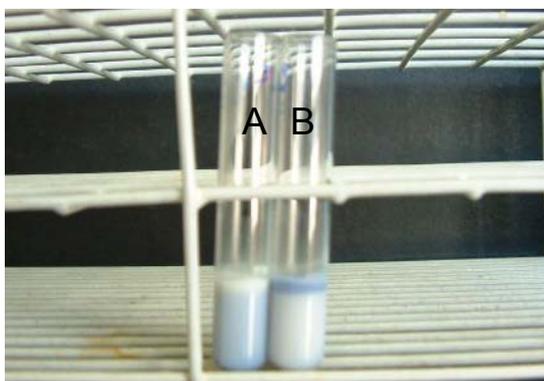


FIGURA 3: Teste do Anel em Leite – amostra negativa (A) e positiva (B).

3.4 Análise estatística

A verificação e concordância entre os testes AAT e TAL foi executada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) de MacNemar, considerando o 2-ME como teste de referência (teste confirmatório).

3.5 Diagnóstico Bacteriológico

3.5.1 Isolamento

Foi realizado o cultivo para o isolamento de *Brucella* sp. nas 205

amostras de leite. As amostras foram semeadas em placas contendo meio de cultivo seletivo para *Brucella* (Meio de Farrel) (Anexo 1). De cada amostra de leite foram realizadas duas semeaduras por esgotamento: da camada de gordura superior e do sedimento da amostra. Estes materiais eram obtidos após a centrifugação a 6000 g por 15 minutos. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo entre 5 e 10% de CO₂ e também em O₂ livre, permanecendo até 30 dias (Alton *et al.*, 1988). Diariamente, as placas eram examinadas visando verificar o surgimento de algum microrganismo, especialmente colônias compatíveis com o gênero *Brucella*. Após a observação macroscópica da morfologia colonial, era realizada a coloração de Gram das amostras.

3.5.2 Caracterização bioquímica dos isolados

Após isolamento das colônias suspeitas, foram realizados os testes da catalase, citrato, crescimento em ágar MacConkey, hemólise, indol, motilidade, oxidase, produção de urease, redução de nitratos, produção de H₂S e sensibilidade a corantes, conforme as especificações de Alton *et al.* (1988) e MacFaddin (2000). Os corantes utilizados (azul de tionina – 20 µg/mL e fucsina básica – 20 µg/mL) e o antimicrobiano penicilina (5 UI/mL) foram acrescentados ao meio ágar triptose.

3.5.3 Confirmação molecular dos isolados

A confirmação dos isolados de *Brucella* sp. foi realizada através da PCR simples utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene que codifica

uma proteína de 31 kDa (*BCSP31*) (Mayfield *et al.*, 1988; Da Costa *et al.*, 1996). Foi utilizado um par de oligonucleotídeos (Bruc 887 e Bruc 1457), sendo cada um constituído de 24 pares de base. O fragmento de DNA esperado após a amplificação possui 594 pares de base.

Para a confirmação dos isolados também foi realizada a PCR simples utilizando oligonucleotídeos específicos da *IS6501/ 711* (Ouahrani *et al.* 1993; Halling *et al.*, 1993). Foi utilizado um par de oligonucleotídeos (IS3 e IS4), sendo cada um constituído de 24 pares de base (Hénaut, 1998). O fragmento de DNA esperado após a amplificação possui 258 pares de base.

As reações de PCR foram realizadas em um equipamento termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler Personal, com capacidade para 25 microtubos de 200 µL.

Para a PCR foi utilizado como amostra 1-2 colônias do cultivo de *Brucella* diluída em 200 µL de Tris-EDTA, fervidos inicialmente por 30 minutos para inativação das bactérias. Antes da PCR, este material era aquecido por 5 minutos.

Para cada PCR foi utilizado DNA de *Brucella abortus* cepa 1119-3 como controle positivo e água milli-Q estéril como controle negativo da reação.

3.5.3.1 Condições de amplificação

Foram adotadas as mesmas condições de amplificação para os oligonucleotídeos Bruc 887/ 1457 (Da Costa *et al.*, 1996) e IS3/ IS4 (Hénaut, 1998).

5 pré-ciclos:

Desnaturação: 94°C por 1 minuto

Anelamento: 60°C por 1 minuto

Extensão: 72°C por 2 minutos

35 ciclos:

Desnaturação: 94°C por 1 minuto

Anelamento: 55°C por 1 minuto

Extensão: 72°C por 2 minutos

Após o término dos ciclos foi realizada a extensão final a uma temperatura de 72°C por 10 minutos.

3.5.3.2 Análise dos produtos amplificados

Os produtos da reação foram visualizados após separação por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL com visualização posterior em transluminador ultravioleta. Foi utilizado o tampão de corrida TBE 1X (0,04 M Tris-Base, 0,001 M EDTA, pH 8,0) segundo Sambrook *et al.* (1989) em cuba horizontal com uma voltagem de 70 V por aproximadamente 30 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico Imunológico

4.1.1 Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e Teste do 2-Mercaptoetanol

Foram realizados testes sorológicos de 476 animais. No teste do AAT obteve-se 137 reagentes (28,8%). Destes reagentes nesta prova de triagem, 117 foram confirmados na prova do 2-ME, representando 24,6% dos animais testados. Apenas 20 amostras que apresentaram reação no teste do AAT, não confirmaram no teste do 2-ME.

Do total de 25 propriedades analisadas, 13 apresentaram animais reagentes na prova do AAT (52%). Estas 13 propriedades foram positivas na prova confirmatória (2-ME), o que confirma a presença de brucelose nestas propriedades (Tabela 6).

Em relação aos municípios estudados, de um total de 18, 11 registraram amostras positivas no teste do AAT (61%). Estes 11 municípios apresentaram amostras reagentes no teste do 2-ME, demonstrando a presença de brucelose nestes municípios e indicando a necessidade de medidas de controle, já que a maioria das propriedades não realiza a vacinação dos animais.

TABELA 6: Distribuição dos resultados de animais reagentes nos testes sorológicos do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2- Mercaptoetanol (2-ME), conforme o município. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Propriedade	Município	AAT	2-ME	Total de animais testados
1*	Bagé*	0	NR	28
2	Bom Jesus	0	NR	3
3	Cidreira	0	NR	2
4	Dom Pedrito	2	1	2
5	Dom Pedrito	0	NR	4
6	Eldorado do Sul	2	2	3
7	Eldorado do Sul	0	NR	3
8*	Eldorado do Sul*	0	NR	19
9	Erechim	4	4	4
10	Estância Velha	58	46	136
11	Frederico Westphalen	16	10	81
12	Gravataí	0	NR	3
13	Gravataí	0	NR	2
14	Ijuí	0	NR	5
15	Ijuí	0	NR	5
16	Nova Bassano	24	24	24
17	Protásio Alves	0	NR	9
18	Sananduva	9	9	9
19	S.Francisco de Paula	2	1	2
20*	Sentinela do Sul*	0	NR	9
21	Três Palmeiras	2	2	7
22	Viamão	1	1	2
23	Viamão	1	1	2
24	Viamão	14	14	110
25	Vila Maria	2	2	2
Total		137	117	476

*Propriedades que adotavam a vacinação contra a brucelose. NR: Não realizado.

As propriedades que adotavam a vacinação contra a brucelose estavam situadas nos municípios de Bagé (propriedade 1), Eldorado do Sul

(propriedade 8) e Sentinela do Sul (propriedade 20), não apresentaram animal reagente nos testes sorológicos. Pode-se observar que, apesar da vacinação, não houve problemas de reações falso-positivas, provavelmente pela coleta ter sido realizada em animais com mais de 24 meses, ainda que não tenha sido possível estabelecer a idade dos animais na coleta.

O teste do AAT é reconhecido pela alta sensibilidade, baixo custo, praticidade, rapidez e fácil execução foi o teste de triagem utilizado, pois é capaz de detectar o maior número de animais infectados (Hunter & Allen, 1972). Segundo revisão de Nielsen (2002), o teste do rosa de bengala apresenta uma sensibilidade entre 21 e 98,3% e uma especificidade entre 68,8 e 100% no diagnóstico da brucelose bovina. Molnár *et al.* (2002) encontrou 91,4% de sensibilidade e 94% de especificidade no teste do AAT, em 440 amostras de soro bubalino. A sensibilidade do AAT é superior à FC na detecção de animais infectados não vacinados, porém com menor especificidade (Hubber & Nicoletti, 1986). Apesar das características positivas do teste do AAT, deve ser destacado que nenhum teste identifica corretamente 100% dos animais.

A combinação de dois testes é de grande utilidade para confirmação de casos de brucelose (Megid *et al.*, 2000; la Orden, 2003; Brasil, 2005). O teste do 2-ME foi o teste confirmatório utilizado, sendo relatada sensibilidade entre 56,2 e 100% e especificidade entre 99,8 e 100%, dependendo do laboratório onde este é realizado (Nielsen, 1992). De 137 amostras reagentes no teste do AAT, 117 foram confirmadas no teste do 2-ME, aumentando a especificidade do procedimento diagnóstico e diminuindo o número teórico de

falso-positivos. Carneiro *et al.* (2005) testaram 400 amostras de soro caprino no estado da Bahia, encontrando 36 reagentes na prova de triagem, mas somente 3 na prova confirmatória. Utilizando a mesma metodologia, Tenório *et al.* (2004), encontraram uma prevalência de 8,57% de animais positivos através do teste do AAT e 7,15% através do 2-ME, em rebanhos leiteiros no estado de Alagoas.

O diagnóstico utilizando os dois testes em série aumenta a especificidade do resultado podendo as reações não confirmadas pelo 2-ME, serem reações inespecíficas ou na fase inicial da infecção, tendo em vista que as reações inespecíficas podem estar associadas à similaridade da composição antigênica de outros microrganismos.

Na fase inicial da doença, onde ainda não é detectada a presença de IgG, o teste do 2-ME pode não detectar anticorpos e, conseqüentemente apresentar resultados falso-negativos.

Se fossem animais vacinados, o que não é o caso, a persistência de anticorpos aglutinantes devido à utilização da vacina B19 poderia causar reações falso-positivas. Embora esta situação possa ocorrer, dificilmente os anticorpos vacinais são detectados após os 18 meses, quando as terneiras são vacinadas entre os 3 e 8 meses de idade (Ribeiro *et al.*, 1997; Jacobo *et al.*, 2005).

Os resultados positivos do 2-ME demonstraram concordância com os resultados do AAT. O 2-ME têm sido apontado como uma prova complementar específica, podendo ser utilizada em substituição à FC,

especialmente naqueles laboratórios que não realizam este teste por dificuldades técnicas e materiais (Megid *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2005).

Em grande parte das reações ocorridas na prova do 2-ME, onde os títulos foram altos (1:100 e 1:200) foi observada a ocorrência do efeito pró-zona, onde ocorre uma inibição da reação nas primeiras diluições do soro (1:25 e 1:50). Esta inibição da reação antígeno-anticorpo está associada à alta concentração de anticorpos nas amostras de soros provenientes de animais cronicamente infectados, especialmente IgG1. Este fenômeno de bloqueio nos testes de soroaglutinação, pró-zona, apresenta uma correlação com amostras positivas no isolamento bacteriológico, como ocorreu no presente trabalho e foi relatado por Rice & Boyes (1971). Tendo em vista que o efeito pró-zona também ocorre no AAT, não pode ser descartada a hipótese de não terem sido detectados mais animais positivos.

No município de Passo Fundo, localizado na região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Poletto *et al.* (2004), encontraram uma prevalência de 1,22% de animais positivos em rebanhos leiteiros, utilizando o teste do AAT como triagem e o teste do 2-Mercaptoetanol como confirmatório. Este resultado demonstrou que a brucelose bovina, apesar da baixa prevalência, ainda está presente em propriedades de gado leiteiro das regiões Noroeste e Nordeste do estado, como foi detectada no presente trabalho nos municípios de Erechim, Frederico Westphalen, Nova Bassano, Sananduva, Três Palmeiras e Vila Maria.

Na Figura 4 pode-se observar a localização dos animais reagentes nas provas sorológicas (AAT e 2-ME).



FIGURA 4: Localização dos animais reagentes positivos nos testes sorológicos (AAT e 2-ME). (Animais Positivos no AAT / Animais Positivos no 2-ME / Animais testados). Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

4.1.2 Teste do Anel em Leite

De um total de 205 amostras de leite submetidas ao TAL, 48 foram consideradas positivas (23,4%) (Anexo 2).

De 20 propriedades analisadas, 13 apresentaram amostras reagentes no TAL. Em 11 municípios foram detectados animais reagentes, de um total de 14 testados, demonstrando a distribuição de amostras positivas no TAL no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 7 e Anexo 2).

TABELA 7: Distribuição dos resultados positivos obtidos nos testes sorológicos (Teste do Anel em Leite – TAL, Antígeno Acidificado Tamponado – AAT e Mercaptoetanol –2-ME), conforme a propriedade e o município. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Propriedade	Município	TAL	AAT	2-ME	Total de animais testados
1*	Bagé*	0	0	NR	28
2	Bom Jesus	0	0	NR	3
3	Cidreira	1	0	0	2
4	Dom Pedrito	1	2	1	2
5	Dom Pedrito	0	0	NR	4
6	Eldorado do Sul	2	2	2	3
7	Eldorado do Sul	0	0	NR	3
8*	Eldorado do Sul*	1	0	0	19
9	Erechim	4	4	4	4
10	Estância Velha	20	20	20	86
11	Frederico Westphalen	0	0	NR	10
12	Gravataí	1	0	0	3
13	Gravataí	0	0	NR	2
14	Ijuí	1	0	0	5
15	Ijuí	0	0	NR	5
16	Nova Bassano	11	11	11	11
17*	Sentinela do Sul*	2	0	0	9
18	Viamão	1	1	1	2
19	Viamão	1	1	1	2
20	Vila Maria	2	2	2	2
Total		48	43	42	205

*Propriedades que adotavam a vacinação contra a brucelose; NR: Não realizado.

De 157 amostras que não apresentaram reação no TAL, apenas uma foi positiva no teste do AAT e não confirmou no 2-ME, sugerindo um resultado falso-positivo no teste do AAT. A concordância entre o TAL e as duas provas sorológicas foi bastante significativa. O TAL demonstrou ser um teste de alta sensibilidade, tendo em vista que todas as 42 amostras positivas no teste do 2-ME foram detectadas pelo TAL.

Por outro lado, de 48 amostras positivas no TAL, 6 não apresentaram reação nas provas sorológicas, inclusive no 2-ME, sendo bastante provável a ocorrência de reações falso-positivas nestas amostras. Como demonstra a Tabela 7, estas amostras eram de propriedades situadas nos municípios de Cidreira (1), Eldorado do Sul (1), Gravataí (1), Ijuí (1) e Sentinela do Sul (2). Destas cinco propriedades, pode-se observar que duas adotavam a vacinação como rotina no manejo sanitário, sugerindo a possibilidade de resultados falso-positivos devido à presença de anticorpos vacinais.

Nestas propriedades foram relatados casos de mastite, bem como a presença de colostro em algumas amostras, o que pode explicar também as reações encontradas. A presença de leucócitos, células de descamação da glândula mamária e, pela similaridade dos componentes antigênicos de alguns microrganismos, podem induzir reações no TAL, como sugere Chielle *et al.* (1989). Estas reações inespecíficas podem estar associadas à presença de IgM, tendo em vista que esta classe de imunoglobulina juntamente com a IgA, são as principais responsáveis pela reação encontrada no TAL (Diaz & Blasco, 1986; Sutra *et al.*, 1986). A IgA, e também a IgM, geralmente estão associadas

com as membranas dos glóbulos de gordura do leite e, neste sentido, amostras de leite com alto teor de gordura também podem levar a resultados falso-positivos (Honkanen-Buzalski & Sandholm, 1981; Silva Júnior *et al.*, 2004).

Em reações inespecíficas, geralmente, não se encontra a presença de IgG no leite. Nas amostras positivas, a IgG que se encontra livre no leite, auxilia a formação do complexo antígeno anticorpo e na junção deste aos glóbulos de gordura, realçando ainda mais a coloração do anel formado na camada superior do tubo (Sutra *et al.*, 1986).

A alta sensibilidade demonstrada pelo teste, além da fácil execução e praticidade, credencia a utilização do TAL como teste de triagem para o diagnóstico da brucelose em rebanhos leiteiros (Nicoletti & Burch, 1969; Roepke & Stiles, 1970; Mylrea, 1972; Rolfe & Sykes, 1987; Sutra & Dubray, 1987).

4.2 Diagnóstico Bacteriológico

4.2.1 Isolamento de *Brucella* sp.

Em 205 amostras de leite, foram isoladas *Brucella* sp. de 15, representando 7,3% deste total (Tabela 8 e Anexo 2).

Este número de 15 amostras pode ser considerado significativo tendo em vista que, muitas vezes, o agente não está presente na amostra de leite ou está em quantidades muito reduzidas, o que impossibilita o seu crescimento. Ainda que a excreção de *Brucella* no leite seja intermitente, existem variações individuais nos animais que podem alterar a sensibilidade da

técnica, variando de 2 a 84% de recuperação do agente nas amostras (Brinley Morgan & McDiarmid, 1960). Embora não tenha sido possível avaliar esta condição, a frequência e a quantidade de eliminação do agente no leite parece ser maior na segunda metade da lactação devido, principalmente, à queda fisiológica na produção láctea e, à conseqüente concentração do microrganismo neste período (Brinley Morgan & McDiarmid, 1960).

Todos os 15 isolados foram obtidos somente a partir do sobrenadante da camada de gordura superior das amostras de leite. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Langoni *et al.* (2000), que isolaram *Brucella* sp. em amostras utilizando o sedimento da amostra de leite, e em nove a partir do sobrenadante, totalizando 15 isolados. Já, Botelho *et al.* (2000) só obteve êxito a partir do sedimento em amostras de leite.

Não foi obtido nenhum isolamento das 56 amostras provenientes das propriedades que realizavam a vacinação contra a brucelose. Embora esta possibilidade tenha sido descrita por Nicoletti & Muraschi (1966), não há relatos recentes desta ocorrência com a utilização da vacina B19 em rebanhos do mundo inteiro.

Apesar do isolamento bacteriológico não apresentar uma sensibilidade muito alta, um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção (Guerrero *et al.*, 1995). Inclusive, alguns autores indicam a inoculação em cobaias, o que possibilita, além da soroconversão, a recuperação e posterior isolamento do agente, aumentando assim, a probabilidade de sucesso no isolamento (Botelho *et al.*, 2000; Langoni *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2002; Nicoletti & Muraschi, 1966; Szyfres & Duran, 1966).

Na Tabela 8 podem ser observados os resultados obtidos no isolamento bacteriológico.

TABELA 8: Distribuição dos resultados obtidos no isolamento bacteriológico, conforme a propriedade e o município. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Propriedade	Município	Isolamentos Positivos	Total de animais testados
1*	Bagé*	0	28
2	Bom Jesus	0	3
3	Cidreira	0	2
4	Dom Pedrito	0	4
5	Dom Pedrito	0	2
6	Eldorado do Sul	0	3
7	Eldorado do Sul	0	3
8*	Eldorado do Sul*	0	19
9	Erechim	0	4
10	Estância Velha	5	86
11	Frederico Westphalen	0	10
12	Gravataí	0	3
13	Gravataí	0	2
14	Ijuí	0	5
15	Ijuí	0	5
16	Nova Bassano	10	11
17*	Sentinela do Sul*	0	9
18	Viamão	0	2
19	Viamão	0	2
20	Vila Maria	0	2
Total		15	205

*Propriedades que adotavam a vacinação contra a brucelose.

O tempo de crescimento dos isolados foi de 3 a 10 dias, característico deste gênero (Botelho *et al.*, 2000; Langoni *et al.*, 2000; Lepe *et*

al., 2001). Ainda assim, todas as amostras testadas foram mantidas sob incubação durante 4 semanas, tendo em vista a possibilidade de um crescimento tardio (Lepe *et al.*, 2001).

As amostras positivas eram provenientes de dois municípios: Estância Velha, onde houve o isolamento em 5 amostras, e Nova Bassano, onde 10 amostras foram isoladas.

Na Figura 5 está apresentada a distribuição da amostragem de leite com o resultado bacteriológico.



FIGURA 5: Localização dos animais positivos e negativos no isolamento de *Brucella* sp. (Animais positivos / Animais testados). Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

As colônias isoladas eram arredondadas, lisas, convexas, translúcidas, apresentavam a superfície brilhante e os bordos lisos. A coloração de Gram demonstrou tratar-se de cocobacilos Gram-negativos.

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados das provas bioquímicas realizadas nos isolados, visando à caracterização e a confirmação do gênero *Brucella*.

TABELA 9: Resultados dos testes bioquímicos das amostras de *Brucella* sp. isoladas a partir do leite. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Amostras	Catalase	Citrato	Crescimento MacConkey	Hemólise	Produção H ₂ S*	Indol	Motilidade (SIM)	Nitrato	Oxidase	Urease
69	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
70	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
71	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
72	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
73	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
180	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
181	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
182	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
183	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
184	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
185	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
186	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
187	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
188	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
189	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+

*Papel filtro com acetato de chumbo; + resultado positivo; - resultado negativo.

Neste trabalho, o meio utilizado para o crescimento de *Brucella* foi o meio de Farrel, que se caracteriza por ser um meio seletivo, onde são adicionados vários antimicrobianos (Anexo 1). Este é o meio indicado pela OIE e por especialistas em brucelose, pois auxilia na inibição da microbiota contaminante que possivelmente possa estar presente nas amostras.

Visando a caracterização dos isolados, foi verificado o crescimento do agente na presença dos corantes tionina (20 µg/mL) e fucsina básica (20 µg/mL) e, também, do antimicrobiano penicilina (5 UI/mL) (Tabela 10).

TABELA 10: Comparação da sensibilidade a corantes (tionina e fucsina), penicilina e a necessidade da presença de CO₂ das amostras de *Brucella* isoladas a partir do leite. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Amostras	Tionina 20 µg/mL	Fucsina 20 µg/mL	Penicilina 5 UI/mL	Requerimento CO ₂	Aglutinação soro polivalente
69	-	+	+	+	+
70	-	+	+	+	+
71	-	+	+	+	+
72	-	+	+	+	+
73	-	+	+	+	+
180	-	+	+	+	+
181	-	+	+	+	+
182	-	+	+	+	+
183	-	+	+	+	+
184	-	+	+	+	+
185	-	+	+	+	+
186	-	+	+	+	+
187	-	+	+	+	+
188	-	+	+	+	+
189	-	+	+	+	+

+ resultado positivo; - resultado negativo.

Não houve crescimento de *Brucella* quando as amostras foram incubadas em oxigênio livre, ocorrendo crescimento somente em atmosfera contendo 5 a 10% de CO₂, o que sugere a identificação de *Brucella abortus* em todos os isolados.

Todos os 15 isolados apresentaram crescimento na presença de fucsina e penicilina, mas foram inibidos na presença de tionina, o que sugere a identificação do biovar 1 ou do biovar 4 de *Brucella abortus* em todas as amostras.

Langoni *et al.* (2000) isolaram *Brucella* em 15 amostras de um total de 49 analisadas em São Paulo e Minas Gerais, sendo apenas uma identificada como biovar 1, oito como biovar 2 e seis como biovar 3, o que demonstra uma variação na distribuição dos isolados, conforme a região estudada. Na Argentina, Szyfres & Duran (1966) isolaram 14 de 34 amostras examinadas identificando 12 como *Brucella abortus* biovar 1 e duas amostras como *Brucella abortus* biovar 4. Na Austrália, somente o biovar 1 de *Brucella abortus* foi isolado em 38 amostras de leite (Mylrea, 1972).

Ao compararmos a intensidade de resposta no teste do 2-ME dos 15 animais confirmados por isolamento para brucelose, podemos observar que os soros dos animais apresentaram os seguintes títulos: 1:200 (11), 1:100 (3) e 1:25 (1).

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados e os títulos obtidos no isolamento bacteriológico e nos testes imunológicos (AAT, 2-ME e TAL) das 42 amostras que foram consideradas positivas através do teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol.

TABELA 11: Comparação dos títulos obtidos (2-ME) com os resultados dos outros testes imunológicos (AAT e TAL) e do isolamento bacteriológico nas 42 amostras positivas no teste do 2-ME. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Número de amostras	2-ME (Título)	AAT	TAL	Isolamento
1	1:25	+	+	+
4	1:25	+	+	-
6	1:50	+	+	-
3	1:100	+	+	+
11	1:200	+	+	+
17	1:200	+	+	-

+ resultado positivo; - resultado negativo.

Quando são analisados os resultados obtidos na prova sorológica confirmatória (2-ME), pode-se perceber que o isolamento ocorreu com maior frequência naquelas amostras em que os animais apresentaram títulos mais altos (1:100 e 1:200), confirmando os índices encontrados por Langoni *et al.* (2000). Entre os isolamentos obtidos, somente um animal apresentou título considerado baixo (1:25) na prova sorológica confirmatória.

O TAL, em amostras individuais, revelou uma correlação positiva com os testes de soroaglutinação e com o isolamento bacteriológico. O TAL concordou com o 2-ME em 85,7% dos casos de brucelose. Ferguson & Robertson (1954) encontraram 93% de concordância do TAL com o 2-ME. Em 31,2% das amostras positivas no TAL, esses autores isolaram *Brucella* sp.

Foi observada concordância de 87% entre o TAL e o AAT ($p \leq 0,01$) nas amostras analisadas. Acypreste *et al.* (2002) encontraram 80% de concordância entre estes testes, em vacas da bacia leiteira de Goiânia, utilizando o TAL em leite de mistura em 45 propriedades analisadas.

Na Tabela 12, estão apresentados os resultados obtidos no isolamento bacteriológico e nos testes sorológicos de 205 amostras de leite e soro dos mesmos animais.

TABELA 12: Comparação dos resultados obtidos no isolamento bacteriológico, com o Teste do Anel em Leite (TAL), com o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e com o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) em 205 amostras de leite e soro das mesmas vacas. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

Isolamento	TAL		AAT		2-ME	
	+	-	+	-	+	-
+	15	0	15	0	15	0
-	33	157	28	162	27	163

+ resultado positivo; - resultado negativo.

Considerando o 2-ME como teste confirmatório, a sensibilidade do AAT e do TAL neste trabalho foi de 100%, o que reafirma a utilização de ambos como testes de triagem para o diagnóstico da brucelose. O AAT apresentou uma especificidade de 98%, enquanto que no TAL a especificidade foi de 87%, quando comparados ao teste do 2-ME. Mas se considerarmos o isolamento como teste padrão ouro, todos os testes imunológicos apresentaram 100% de sensibilidade e, 87% de especificidade para o TAL, 90% para o AAT e 90% para o 2-ME.

Neste trabalho, seis (12,5%) amostras positivas no TAL, de um total de 48, não apresentaram nenhuma evidência de infecção através dos outros testes imunológicos ou do isolamento. Já Farrell & Robertson (1968), examinando 293 amostras positivas no TAL, encontraram 32% de amostras

que não apresentaram confirmação nas provas de soroaglutinação, FC e isolamento.

Analisando que 27 animais apresentaram resultado positivo nos três testes sorológicos, embora não tenha sido possível isolar o agente das amostras de leite, possivelmente estas vacas estivessem eliminando *Brucella* através do leite em algum momento. Entre os diversos fatores que justificam estes resultados, pode-se destacar que, além da coleta, manuseio e conservação das amostras até a chegada no laboratório, apenas uma amostra de leite foi coletada de cada animal. Também, além da excreção intermitente de *Brucella* no leite dos animais infectados, o número de microrganismos viáveis pode ser bastante reduzido quando comparado com outros tecidos, como a placenta e o feto abortado (Alexander *et al.*, 1981; Alton *et al.*, 1988; Langoni *et al.*, 2000).

De 26 propriedades analisadas, apenas três realizavam a vacinação das terneiras contra brucelose, como é preconizado pelo PNCEBT. Nestas três propriedades não foram confirmados casos da doença. Em propriedades leiteiras, a ausência de vacinação tem sido confirmada como um dos principais fatores para que a prevalência da brucelose não diminua e com isso, aumente a possibilidade de transmissão para as famílias rurais (Schein *et al.*, 2004). Tendo em vista a grande importância desta medida profilática no controle e erradicação da brucelose e do seu caráter obrigatório junto ao PNCEBT, não se justifica que esta não seja adotada pelas propriedades. Com base no recente inquérito sorológico realizado neste estado (dados ainda não publicados) e também naqueles realizados em décadas passadas, tem sido

demonstrado que a vacinação das terneiras, na idade de 3 a 8 meses, é uma das ferramentas mais importantes para baixar a prevalência da brucelose bovina (Paulin & Ferreira-Neto, 2002).

Na propriedade localizada no município de Estância Velha por exemplo, foi realizado um acompanhamento sorológico periódico, tendo em vista que nos primeiros testes realizados foram detectados animais reagentes. No Laboratório de Brucelose do IPVDF foram analisadas 712 amostras de soro desde abril de 2004 até abril de 2006, sendo detectados 46 animais positivos através dos testes sorológicos. Nesta propriedade, percebeu-se com clareza o grande prejuízo sanitário e econômico que a brucelose causou. Perdas econômicas com a queda na produção de leite, reposição das matrizes e, sob o aspecto sanitário, o risco de transmissão para os tratadores, tendo em vista o caráter zoonótico da doença. Após o primeiro caso detectado, em abril de 2004, mais de 40 animais infectaram-se, especialmente pelo modo de transmissão da doença e também pelas características de manejo de uma propriedade de gado leiteiro. Acrescenta-se que até o surgimento do primeiro caso de brucelose, a propriedade não realizava a vacinação contra a brucelose, não realizava testes diagnósticos nos animais adquiridos e também não realizava testes periódicos nos animais do tambo. Finalmente, não adotava a orientação de um médico veterinário na condução das medidas sanitárias a serem tomadas. Estes fatores devem ter contribuído para o aumento do número de animais infectados e, conseqüentemente, maiores perdas sanitárias e econômicas nesta propriedade.

4.2.2. Confirmação molecular dos isolados

Todos os 15 isolados identificados como *Brucella* sp. pela bacteriologia foram confirmados como pertencentes ao gênero através da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos do gene *BCSP31* e da sequência de inserção *IS6501 / 711*.

4.2.2.1. Gene *BCSP31*

O gene *BCSP31* tem sido utilizado para a detecção do gênero *Brucella* através da PCR. Da Costa *et al.* (1996) demonstrou a presença deste gene em todas as espécies e biovars de *Brucella*. O diagnóstico molecular da brucelose animal e humana tem sido largamente pesquisado com a utilização do gene *BCSP31* (Baily *et al.*, 1992; Matar *et al.*, 1996; Morata *et al.*, 1999 e 2001; Casañas *et al.*, 2001; Tantillo *et al.*, 2001; Vrioni *et al.*, 2004).

Na Figura 6 pode-se observar que todas as amostras apresentaram o fragmento esperado, contendo 594 pares de base.



FIGURA 6: PCR para confirmação dos isolados de *Brucella* sp., utilizando o par de oligonucleotídeos *Bruc 887* e *Bruc 1457*. Canaletas: 1, amostra 182; 2, amostra 183; 3, amostra 184; 4, amostra 185; 5, amostra 186; 6, amostra 187; 7, amostra 188; 8, amostra 189; 9, marcador de peso molecular 100 pb (Gibco); 10, amostra 69; 11, amostra 70; 12, amostra 71; 13, amostra 72; 14, amostra 73; 15, controle positivo (*Brucella abortus* 1119-3); 16, controle negativo. Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

4.2.2.2. Gene *IS6501 / 711*

A sequência de inserção *IS6501 / 711* foi reconhecida em todos os isolados de *Brucella*, comprovando a utilização deste gene no diagnóstico da brucelose (Bricker & Halling, 1994; Hamdy & Amin, 2002; Baek *et al.*, 2003; Bricker *et al.*, 2003).

Na Figura 7 pode-se observar que todas as amostras apresentaram o fragmento esperado, contendo 258 pares de base.



FIGURA 7: PCR para confirmação dos isolados de *Brucella* sp., utilizando o par de oligonucleotídeos IS3 e IS4 (IS711/6501). Canaletas: 1, amostra 182; 2, amostra 183; 3, amostra 184; 4, amostra 185; 5, amostra 186; 6, amostra 187; 7, amostra 188; 8, amostra 189; 9, marcador de peso molecular 100 pb (Gibco); 10, amostra 69; 11, amostra 70; 12, amostra 71; 13, amostra 72; 14, amostra 73; 15, controle positivo (*Brucella abortus* 1119-3); 16, controle negativo. Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo. Rio Grande do Sul, Brasil, 2006.

A utilização de genes específicos na identificação de microrganismos após o isolamento bacteriológico, e/ou diretamente em amostras de origem animal, pode transformar-se em um ótimo complemento para o diagnóstico, principalmente por ser uma técnica mais rápida em termos de resultado.

5. CONCLUSÕES

O teste do Antígeno Acidificado Tamponado e o teste do Anel em Leite, preconizados como testes de triagem, apresentaram boa concordância com o teste do 2-ME, utilizado como teste confirmatório, demonstrando confiança nos resultados obtidos.

O teste do 2-Mercaptoetanol reafirmou a sua utilização como teste confirmatório, demonstrando ser um teste adequado para a confirmação de casos de brucelose em amostras sorológicas, apresentando uma correlação positiva com os demais testes utilizados.

O teste do Anel em Leite apresentou boa concordância com os demais testes sorológicos e com o isolamento bacteriológico, demonstrando sua validade como teste de triagem e monitoramento de rebanhos leiteiros, como preconiza o PNCEBT.

A utilização de técnicas sorológicas preconizadas pelo PNCEBT, como o teste do AAT, o teste do 2-ME e o TAL, constituem-se em uma forma prática e adequada para o diagnóstico da brucelose bovina.

A brucelose ainda faz parte do contexto sanitário de muitas propriedades em nosso estado. Além das perdas sanitárias e econômicas que ela desencadeia, deve-se destacar a importância do leite na transmissão desta enfermidade para o homem.

Foi obtido o isolamento de *Brucella* em duas das 20 propriedades testadas. O isolamento e caracterização de *Brucella* sp. apresentam grande relevância sob o ponto de vista epidemiológico. A provável identificação de *Brucella abortus* biovar 1 ou 4, confirma os achados anteriores e reafirma a sua presença em rebanhos leiteiros no RS.

A confirmação molecular de *Brucella* sp. em todos os isolados obtidos, demonstra a confiabilidade do diagnóstico bacteriológico e a possibilidade de utilização de mais uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico da brucelose.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vacinação das terneiras contra a brucelose constitui-se em uma medida obrigatória em nosso estado e tem demonstrado, há bastante tempo, ser uma excelente ferramenta no controle da brucelose.

Este trabalho espera poder contribuir com o controle da brucelose bovina no Rio Grande do Sul e, conseqüentemente em nosso país. O envolvimento e a participação de todos os segmentos envolvidos na cadeia produtiva de bovinos, em especial os de produção leiteira, se faz necessário. Somente assim pode-se baixar a prevalência desta doença, diminuir os prejuízos causados pelo impacto da mesma e atingir a fase de erradicação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, Boris. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 2001. p. 28 – 56.

ACYPRESTE, C.S.; DA SILVA, L.A.F.; DE MESQUITA, A.J.; FIORAVANTI, M.C.S.; DIAS FILHO, F.C.; RAMOS, L.S. Diagnóstico da freqüência da brucelose bovina em vacas em lactação na bacia leiteira de Goiânia pelas provas do anel do leite e rosa de bengala. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, p. 59-65, 2002.

ALAPONT ALACREU, J.M.; GÓMEZ LÓPEZ, L.; DELGADO, F.; PALMERO MARTÍ, J.L.; PACHECO BRU, J.J.; PONTONES MORENO, J.L.; JIMÉNEZ CRUZ, J.F. Orquiepididimitis por Brucela. **Actas Urológicas Españolas**, Madri, v. 28, p. 774-776, 2004.

AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; HENSEL, A.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H.C.; HAGEN, R.M.; NEUBAUER, H. Human Brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlim, v. 24, p. 450-456, 2005.

ALEXANDER, B.; SCHNURRENBERGER, P.R.; BROWN, R.R. Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal of two naturally infected cows. **The Veterinary Record**, Londres, v. 108, p. 500, 1981.

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

AMIN, K.M.R.; RAHMAN, M.B.; RAHMAN, M.S.; HAN, J.; PARK, J.; CHAE, J. Prevalence of *Brucella* antibodies in sera of cows in Bangladesh. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 6, p. 223-226, 2005.

ARIMI, S.M.; KOROTI, E.; KANG'ETHE, E.K.; OMORE, A.O.; MCDERMOTT, J.J. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 96, p. 1-8, 2005.

BAEK, B.K.; LIM, C.W.; RAHMAN, M.S.; C-HYUN KIM, A.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 67, p. 312-314, 2003.

BALDWIN, C.L. Immune response overview. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 365-366, 2002.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal Tropical Medical and Hygien**, Londres, v. 95, p. 271-275, 1992.

BARDENSTEIN, S.; MANDELBOIM, M.; FICHT, A.; BAUM, M.; BANAI, M. Identification of the *Brucella melitensis* Vaccine Strain Rev. 1 in Animals and Humans in Israel by PCR Analysis of the *PstI* Site Polymorphism of Its *omp2* Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1475-1480, 2002.

BEH, K. J. Quantitative Distribution of *Brucella* Antibody amongst Immunoglobulin Classes in Vaccinated and Infected Cattle. **Research Veterinary in Science**, Oxford, v. 17, p. 1-4, 1974.

BENSLIMANI, A.; FENOLLAR, F.; LEPIDI, H.; RAOULT, D. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, p. 216-224, 2005.

BOTELHO, A.P.; MOTA, R.A.; D,A SILVA, L.B.G.; SANTOS FILHO, A.S.; COELHO, R.M.S; DE LIMA, E.T. Recuperação de *Brucella abortus* do leite *in natura* procedente de vacas soropositivas dos municípios de Pedra e Venturosa-PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 73, p. 72-77, 2000.

BLYTHMAN, I.G.; FORMAN, A.J. The use of preserved milk samples in the *Brucella* milk ring test. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 53, p. 184-186, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT**. Brasília, 2005. 190 p.

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

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 2660-2666, 1994.

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

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 435 - 446, 2002b.

BRICKER, B.J.; EWALT, D. R.; OLSEN, S.C.; JENSEN, A.E. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. **Journal Veterinary of Diagnostic and Investigation**, Columbia, v.15, p. 374-378, 2003.

BRINLEY MORGAN, W.J.; McDIARMID, A. The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 1, p. 53-56, 1960.

CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; ODEÓN, A.C.; CIPOLLA, A.L.; ODRIOZOLA,, E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 27, p. 359-369, 2003.

CARNEIRO, J.; ZACHARIAS, F.; PACHECO, S.T.; MENDONÇA-LIMA, F.W. Investigaçãõ da soropositividade para brucelose em rebanhos caprinos produtores de leite para consumo humano. **Revista Brasileira de Saude e Produçãõ Animal**, Salvador, v. 6, p. 53-58, 2005.

CASAÑAS, M.C.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; RODRIGUEZ-TORRES, A.; ORDUÑA, A.; COLMENERO, J.D.; MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31- kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlim, v. 20, p. 127-131, 2001.

CENTRO PANAMERICANO de ZOONOSIS. **Técnicas de Sero-aglutinación**. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, 1968 (Nota Técnica, 2).

CENTRO PANAMERICANO de ZOONOSIS. **Pruebas suplementarias para el diagnostico de la Brucelosis**. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, 1982 (Nota Técnica, 25).

CHIELLE, L.L; WEIBLEN, R.; MOREIRA, W.S.; FLÔRES, M.L. Especificidade da Prova do Anel de Leite (PAL) para o diagnóstico da brucelose bovina na bacia leiteira do município de Santa Maria – RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.19, p. 351-358, 1989.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; GREPINET, O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. **Microbiology**, Washington, v. 141, p. 2111-2121, 1995.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; PAQUET, J.Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 729-738, 2001.

CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GRÉPINET, O.; BOUMEDINE, K.S. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 593-602, 2003.

CORBEL, M.J.; BRINLEY MORGAN, W.J. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1984. v.1, p.377-388.

CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. **The Veterinary Journal**, v.172, p.114-120, 2006.

DA COSTA, M.; GUILLOU, J.P.; GARIN-BASTUJI, B.; THIEBAUD, M.; DUBRAY, G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. **Journal Applied of Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 267-275, 1996.

DE LEY, J.; MANNHEIM, W.; SEGERS, P. LIEVENS, A.; DENIJN, M.; VANHOUCHE, M.; GILLIS, M. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, p. 35-42, 1987.

DELVECCHIO, V. G.; KAPATRAL,V.; REDKAR, R.J.; PATRA, G.; MUJER, C.; LOS, T.; IVANOVA, N.; ANDERSON, I.; BHATTACHARYYA, A.; LYKIDIS, A.; REZNIK, G.; JABLONSKI, L.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; BERNAL, A.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; SELKOV, E.; ELZER, P. H.; HAGIUS, S.; O'CALLAGHAN, D.; LETESSON, J. J.; HASELKORN, R.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 443-448, 2002.

DIAZ, R.; BLASCO, J.M. **Diagnostico Inmunologico**. In: TRATADO de Veterinaria Practica. Madrid: Spain 9, 1986. p. 55-69.

DOKUZOĞUZ, B.; ERGÖNÜL, O.; BAYKAM, N.; ESENER, H.; KILIÇ, S.; ÇELIKBAŞ, A.; EREN, Ş.; ESEN, B. Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. **The Journal of Infection**, Londres, v. 50, p. 41-45, 2005.

FARRELL, I. D., ROBERTSON, L. A whey complement fixation test. Its relation to whey agglutination and isolation of *Brucella abortus* from the milk of individual cows. **Journal of Hygiene**, Londres, v. 66, p. 19-26, 1968.

FARREL, I.D. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 16, p. 280-286, 1974.

FEKETE, A.; BANTLE, J.A.; HALLING, S.M.; SANBORN, M.R.; Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, p. 216-227, 1990.

FERGUSON, G.S.; ROBERTSON, A. The use of the milk ring test in a survey of the incidence of bovine brucellosis in Southern Scotland. **The Journal of Hygiene**, Londres, v. 52, p. 24-36, 1954.

FERREIRA, C.R.; FERREIRA, C.R.; TATAGIBA, T.A.; SOUTO FILHO, J.T.D. Espondilodiscite brucelósica: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, p. 255-258, 2002.

FIORI, P.L.; MASTRANDREA, S.; RAPPELLI, P.; CAPPUCINELLI, P. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2005-2006, 2000.

FOSTER, G.; MACMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H.M.; CLOECKAERT; REID, R.J.; BREW, S.; PATTERSON, I.A.P. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 563-580, 2002.

FREITAS, J.A.; GALINDO, G.A.R.; SANTOS, E.J.C. Zoonotic brucellosis risk associated with clandestine slaughtered porks. **Revista Española de Salud Pública**, Madri, v. 35, p. 101-102, 2001.

FREITAS, J.A.; SANTOS, E.J.C.; OLIVEIRA, J.P. Isolamento de *Brucella* sp em produtos de origem animal e significado em saúde pública. **Revista de Ciências Agrárias de Belém-PA**, Belém, v. 37, p. 147-154, 2002.

GHOSH, D.; GUPTA, P.; PRABHAKAR, S. Systemic brucellosis with chronic meningitis: a case report. **Neurology India**, Bombay, v. 47, p. 58-60, 1999.

GOTUZZO, E.; SEAS, C.; GUERRA, J.G.; CARRILLO, C.; BOCANEGRA, T.S.; CALVO, A.; CASTAÑEDA, O.; ALARCON, G.S. Brucellar arthritis: a study of 39 Peruvian families. **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 46, p. 506-509, 1987.

HALLING, S.M.; TATUM, F.M.; BRICKER, B.J. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. **Gene**, Amsterdam, v. 133, p. 123-127, 1993.

HALLING, S.M.; BURCH, B.D.P.; BRICKER, B.J.; ZUERNER, R.L.; QING, Z.; LI, L.L.; KAPUR, V.; ALT, D.P.; OLSEN, S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 2715-2726, 2005.

HAMDY, M.E.; AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 163, p. 299-305, 2002.

HECK, F.C.; NIELSEN, K.H.; WILLIAMS, J.D.; CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G. Sensitivity of serological methods for detecting antibody in vaccinated and non-vaccinated *Brucella*-infected cows. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 61, p. 265-266, 1984.

HÉNAUT, S. **Intérêt de l'IS 6501/711 dans la détection et le typage des *Brucella***. Lyon: Université Lyon. ENV, 1998. 100f. Dissertação (Mestrado - Écologie Microbienne) - Pós-graduação em Ecologia Microbiana "*Diplome des Études Approfondies*", École Nationale de Vétérinaire, Université Lyon, Lyon, 1998.

HERMAN, L.; DE RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2099-2101, 1992.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; SANDHOLM, M. Association of bovine secretory immunoglobulins with milk fat globule membranes. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 4, p. 329-342, 1981.

HORNITZKY, M.; SEARSON, J. The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 63, p. 172-174, 1986.

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

HUNTER, D.; ALLEN, J. An evaluation of milk and blood tests used to diagnose brucellosis. **The Veterinary Record**, Londres, v. 91, p. 310-312, 1972.

IA ORDEN, J. L. Relevamiento serológico de infección por *Brucella abortus* en establecimientos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 84, p. 200-203, 2003.

JACOBO, R.A.; STORANI, C.A.; CIPOLINI, M.F.; MARTÍNEZ, D.E. Anticuerpos vacunales em bubillas inoculadas com la cepa C19 de *Brucella abortus*. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v. 86, p. 195-198, 2005.

JANNEY, G.C.; BERMAN, D.T.; ERDMANN, A.A. The relative efficiency of the milk ring test and area blood tests for bovine brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 133, p. 586-589, 1958.

KOCHAR, D.K.; KUMAWAT, B.L.; SHUBHARAKARAN, ASERI, S.; SHARMA, B.V.; RASTOGI, A. Meningoencephalitis in brucellosis. **Neurology India**, Bombay, v. 48, p. 170-173, 2000.

KUPLULU, O.; SARIMEHMETOGLU, B. Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. **Food Control**, Guildford, v. 15, p. 511-514, 2004.

LACERDA, L.M.; ALVES, L.M.C.; MATHIAS, L.A.; RODRIGUES, A.L.B.; ALMEIDA, F.M. Brucelose em trabalhadores de matadouros do município de São Luís, MA, 1997. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, p. 62-65, 2000.

LANGONI, H.; ICHIHARA, S. M.; DA SILVA, A.V.; PARDO, R.B.; TONIN, F.B.; MENDONÇA, L.J.P.; MACHADO, J.A.D. Isolation of *Brucella* spp. from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, p. 444-448, 2000.

LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I.O.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J.P. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3087-3090, 1995.

LEAL-KLEVEZAS, D.S.; MARTINEZ-VAZQUEZ, I.O.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTINEZ-SORIANO, J.P. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, p. 91-97, 2000.

LEITE, R.M.H.; THOMPSON, J.A.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; LAGE, A.P. A random sample survey of bovine Brucellosis in the State of Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 170-174, 2003.

LEPE, J.A.; GUERRERO, F.J.; GARRIDO, A.; PEREA, R. Detección de *Brucella melitensis* por el sistema BACTEC 9050. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 6, p. 267-269, 2001

LÓPEZ RODRÍGUEZ, R.; ARIAS RIVAS, S.; GONZÁLEZ BABARRO, E.; MARTÍNEZ REY, C.; ALENDE SIXTO, M.R. Orquiepididimitis brucelósica. **Anales de Medicina Interna**, Madrid, v. 22, p. 400, 2005.

LUCERO, N.E.; BOLPE, J.E. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1425-1427, 1998.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3rd. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912 p.

MAGALHÃES, V.; LIMA, R.A. Brucelose: relato de dois casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, Belo Horizonte, v. 71, p. 9-10, 1997.

MAINAR-JAIME, R.C.; MUÑOZ, P.M.; MIGUEL, M.J.; GRILLÓ, M.J.; MARÍN, C.M.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J.M. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella*-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 46, p. 913-916, 2005.

MARÍN, C.M.; ALABART, J.L.; BLASCO, J.M. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 426-428, 1996.

MARTIN-MAZUELOS, E.; NOGALES, M.C.; FLOREZ, C.; GÓMEZ-MATEOS, J.M.; LOZANO, F.; SANCHEZ, A. Outbreak of *Brucella melitensis* among Microbiology Laboratory Workers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 2035-2036, 1994.

MATAR, G.M.; KHNESSER, I.A.; ABDELNOOR, A.M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* antigen DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 477-478, 1996.

MATHIAS, L.A.; CHAVES, L.F.; CHEN, A.A.; GIRIO, R.J.S.; NETO, W.V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 139-142, 2001.

MAYFIELD, J.E.; BRICKER, B.J.; GODFREY, H.; CROSBY, R.M.; KNIGHT, D.J.; HALLING, S.M.; BALINSKY, D.; TABATABAI, L.B. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. **Gene**, Amsterdam, v. 63, p. 1-9, 1988.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 37, p. 1-8, 2000.

MÉNDEZ MARTINEZ, C.; PÁEZ JIMÉNEZ, A.; CORTÉS BLANCO, M.; SALMORAL CHAMIZO, E.; MOHEDANO MOHEDANO, E.; PLATA, C.; VARO BAENA, A.; MARTINEZ NAVARRO, F. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalucía (Spain). **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 8, p. 164-168, 2003.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 41-44, 2002.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; REGUERA, J.M.; GARCIA-ORDOÑEZ, M.A.; PICHARDO, C.; COLMENERO, J.D. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 4163-4166, 1999.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; REGUERA, J.M.; MIRALLES, F.; LOPEZ-GONZALES, J.J.; COLMENERO, J.D. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3473-3746, 2001.

MYLREA, P.J. The diagnosis of brucellosis in dairy herds. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 48, p. 369-375, 1972.

NASCIMENTO, M.G.F.; CUNHA, C.P.; JESUS, V.L.T.; LIGNON, G.B.; NASCIMENTO, E.R. Levantamento de *Brucella abortus* em queijos minas frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 101, p. 63-66, 2002.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ, J.A.; SOLERA, J. Comparasion of threee different methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. **Imunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 1435, p. 1-5, 2002.

NICOLETTI, P.; MURASCHI, B.S. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 27, p. 689-694, 1966.

NICOLETTI, P.; BURCH, G.E. A comparision of the tube agglutination, supplemental, and brucellosis ring tests in selcted dairy herds in New York. **The Cornell Veterinarian**, New York, v. 59, p. 349-353, 1969.

NICOLETTI, P.; RING, J.; BOYSEN, B.; BUCZEK, J. Illness in a veterinary student following accidental inoculation of *Brucella abortus* strain 19. **Journal American College of Health**, Baltimore, v. 34, p. 236-237, 1986.

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

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NOCOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O: 9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, p. 25-30, 2004.

OCAMPO-SOSA, A.A.; AGUERO-BALBIN, J.; GARCIA-LOBO, J.M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 110, p. 41-51, 2005.

OIE. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. Bovine Brucellosis. Paris, 2000. p. 328-345.

OUAHRANI, S.; MICHAUX, S.; WIDADA, J.S.; BOURG, G.; TOURNEBIZE, R.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J.P. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, p. 3265-3273, 1993.

OUAHRANI-BETTACHE, S.; SOUBRIER, M.-P.; LIAUTARD, J.-P. IS6501-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 154-164, 1996.

PATTERSON, J.M.; ROEPKE, M.H.; DEYOE, B.L. Standardization of test-negative cream for *Brucella* milk ring test. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 35, p. 119-120, 1974.

PATTERSON, J.M.; DEYOE, B.L. Effect of physical properties of milk fat globules on *Brucella* Ring Test sensitivity. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 60, p. 851-856, 1976.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. A Experiência Brasileira no Combate à Brucelose Bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 105-112, 2002.

PAULSEN, I. T.; R. SESHADRI, R.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A.; HEIDELBERG, J.F.; READ, T.D.; DODSON, R.J.; UMayAM, L.; BRINKAC, L.M.; BEANAN, M.J.; DAUGHERTY, S.C.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; NELSON, W.C.; AYODEJI, B.; KRAUL, M.; SHETTY, J.; MALEK, J.; VAN AKEN, S.E.; RIEDMULLER, S.; TETTELIN, H.; GILL, S.R.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; HOOVER, D.L.; LINDLER, L.E.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M.; C. M. FRASER, C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 13148–13153, 2002.

PELED, N.; DAVID, Y; YAGUPSKY, P. Bartholin's gland abscess caused by *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 917-918, 2004.

PINTO, J.P.A.N. Implicações da tuberculose animal na comercialização de produtos de origem animal e na saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 109, p. 31-33, 2003.

PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, p. 147-154, 2005.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R.; VASSAL, L.; AUCLAIR, J.; MOCQUOT, G. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk. **Le Lait**, Lion, v. 68, p. 115-120, 1988.

POESTER, F.P. Utilização de provas complementares como elemento auxiliar no diagnóstico da Brucelose. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 3, p. 61-71, 1975.

POESTER, F. P.; RAMOS, E. T.; BENFICA, A.C. Dificuldades na interpretação de algumas provas sorológicas em bovinos vacinados contra brucelose. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 5, p. 53-58, 1978.

POESTER, F.P. *Brucella*. In: GUERREIRO, M. (Coord.). **Bacteriologia Especial**: com interesse em saúde animal e saúde pública. Porto Alegre: Sulina, 1984. Cap.20, p. 214-244.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 55 – 61, 2002.

POLETTO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 595-598, 2004.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; DELBEM, A.C.B.; LARA, J.A.F.; PERRI, S.H.V. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, p. 31-38, 2001.

RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; RATTI JR, J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti - *Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B 19. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, p. 137-150, 1997.

RICE, C.E.; BOYES, B. Serum immunoglobulins in bovine brucellosis. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 19, p. 146-154, 1971.

RIJPENS, N.P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; ROSSAU, R.; HERMAN, L.M.F. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1683-1688, 1996.

RODRIGUEZ VALIN, M. E.; POUSA ORTEGA, A.; PONS SANCHEZ, C.; LARROSA MONTAÑÉS, A.; SÁNCHEZ SERRANO, L.P.; MARTÍNEZ NAVARRO, F. Brucellosis as an occupational disease: study of an airborne transmission outbreak in a slaughterhouse. **Revista Española de Salud Pública**, Madrid, v. 75, p. 159-170, 2001.

ROEPKE, M.H.; STILES JR, F.C.; DRIVER, F.C. The efficacy of the Brucellosis Ring Test in Certifying Areas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 133, p. 93-96, 1958.

ROEPKE, M.H.; STILES JR, F.C. Potential Efficiency of Milk Ring Test for Detection of Brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 31, p. 2145-2149, 1970.

ROEPKE, M.H.; PATTERSON, J.M.; DEYOE, B.L. *Brucella* Ring Test Sensitivity of Individual and Pooled Bovine Milks with Various Preservatives. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v. 35, p.115-118, 1974.

ROLFE, D.C.; SYKES, W.E. Monitoring of dairy herds for *Brucella abortus* infection when prevalence is low. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 64, p. 97-100, 1987.

ROMERO, C.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 615-617, 1995.

ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, M.J.; DIAZ, R.; BLASCO, J.M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 3198-3200, 1995.

ROMERO, C.; LÓPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3735–3737, 1999.

SALGADO, E.A.; JARAMILO, C.J.; SÁNCHEZ, L.S.; FRAGOSO, H.; GARCIA, J. Estudio de brucelosis a partir de muestras de leche de bovinos em el trópico subhúmedo del estado de Guerrero. **Veterinaria México**, México, v. 26, p. 359-363, 1995.

SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 16, p. 95-101, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS-NETO, L.L.; COSTA, G.P.; SIMAAN, C.K.; LIMA, F.A.C. Abscesso esplênico por *Brucella abortus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, p. 53-55, 1999.

SCHEIN, F.B.; SANTOS, M.D.; SIQUEIRA, A.A.F.; MOSQUETTE, R.; FREITAS, S.H.; CASTRO, R.S.; SIMÕES, R.S.; CAMARGO, L.M. Prevalência de brucelose em bovinos de leite e fatores de risco associados à transmissão em seres humanos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 540-542, 2004.

SERRA, J.; VIÑAS, M. Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, p. 53-58, 2004.

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

STACK, J. A.; HARRISON, M.; PERRETT, L.L. Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 724-728, 2002.

SUTHERLAND, S. S. Assessment of an intradermal test for the detection of bovine brucellosis. **Veterinary Research Communications**, New York, v. 6, p. 297-304, 1983.

SUTRA, L.; CAFFIN, J.P.; DUBRAY, G. Role of milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 359-366, 1986.

SUTRA, L.; DUBRAY, G. Interpretation des discordances entre le Ring Test et les épreuves serologiques utilisées dans le dépistage de la brucellose bovine. **Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique de France**, Paris, v. 71, p. 565-577, 1987.

SZYFRES, B.; DURÁN, A. Investigación sobre la presencia de *Brucella* em la leche de abasto de la ciudad de azul, Argentina. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, p. 391-395, 1966.

TANTILLO, G.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella spp.* in milk and cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, p. 164-167, 2001.

TENÓRIO, A.C.B.; SILVA, F.F.; RAMOS, T.R.R.; NUNES, K.B. Prevalência da brucelose bovina em rebanhos leiteiros da microrregião de Batalha – AL – Brasil. **Ciência Veterinária Tropical**, Salvador, v. 7, p. 106-111, 2004.

DEMULAPALLI, R.; McQUISTON, J.R.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; HALLING, S.M.; BOYLE, S.M. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, p. 760-764, 1999.

VILLAMARÍN-VÁZQUEZ, J.L.; CHIVA-NEBOT, F.; ARNEDO-PENA, A. Seroprevalencia de brucelosis en trabajadores agrícolas de las comarcas costeras de Castellón, España. **Salud Pública de México**, México, v. 44, p. 137-139, 2002.

VRIONI, G.; GARTZONIKA, C.; KOSTOULA, A.; BOBOYIANNI, C.; PAPAPOPOULOU, C.; LEVIDIOTOU, S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 23, p. 194-199, 2004.

WALLACH, J.C.; MIGUEL, S.E.; BALDI, P.C.; GUARNERA, E.; GOLDBAUM, F.A.; FOSSATI, C.A. Urban outbreak of a *Brucella melitensis* infection in an Argentine family: clinical and diagnostic aspects. **Immunology and Medical Microbiology**, Ames, v. 8, p. 49-56, 1994.

WALLACH, J.C.; GIAMBARTOLOMEI, G.H.; BALDI, P.C.; FOSSATI, C.A. Human Infection with M-Strain of *Brucella canis*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, p. 146-148, 2004.

YAGUPSKY, P.; PELED, N. Use of the Isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3878, 2002.

YAGUPSKY, P.; BARON, E. J. Laboratory exposures to Brucellae and implications for bioterrorism. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, p. 1180-1186, 2005.

YOUNG, E. J. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 359-372, 1991.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1:

Meio de Farrel:

- Ágar triptose 1000 mL
- Soro bovino 5% 50 mL
- Antimicrobianos:
 - Ácido Nalidíxico 5 mg
 - Bacitracina 25.000 UI
 - Cicloheximida 100 mg
 - Nistatina 100.000 UI
 - Polimixina B 5.000 UI
 - Vancomicina 20 mg

8.2 Anexo 2:

Tabela contendo a identificação das 205 amostras de leite e soro distribuídas por município e os resultados dos testes realizados.

AMOSTRA	MUNICÍPIO	LEITE			SORO		
		ISOLAMENTO	TAL	AAT	SAL	MERCAPTO	
1	Bagé	0	0	0	X	X	
2	Bagé	0	0	0	X	X	
3	Bagé	0	0	0	X	X	
4	Bagé	0	0	0	X	X	
5	Bagé	0	0	0	X	X	
6	Bagé	0	0	0	X	X	
7	Bagé	0	0	0	X	X	
8	Bagé	0	0	0	X	X	
9	Bagé	0	0	0	X	X	
10	Bagé	0	0	0	X	X	
11	Bagé	0	0	0	X	X	
12	Bagé	0	0	0	X	X	
13	Bagé	0	0	0	X	X	
14	Bagé	0	0	0	X	X	
15	Bagé	0	0	0	X	X	
16	Bagé	0	0	0	X	X	

AMOSTRA	MUNICÍPIO	LEITE			SORO	
		ISOLAMENTO	TAL	AAT	SAL	MERCAPTO
17	Bagé	0	0	0	X	X
18	Bagé	0	0	0	X	X
19	Bagé	0	0	0	X	X
20	Bagé	0	0	0	X	X
21	Bagé	0	0	0	X	X
22	Bagé	0	0	0	X	X
23	Bagé	0	0	0	X	X
24	Bagé	0	0	0	X	X
25	Bagé	0	0	0	X	X
26	Bagé	0	0	0	X	X
27	Bagé	0	0	0	X	X
28	Bagé	0	0	0	X	X
29	Bom Jesus	0	0	0	X	X
30	Bom Jesus	0	0	0	X	X
31	Bom Jesus	0	0	0	X	X
32	Cidreira	0	1	0	X	X
33	Cidreira	0	0	0	X	X
34	Dom Pedrito 1	0	1	1	1	1
35	Dom Pedrito 1	0	0	1	1	0
36	Dom Pedrito 2	0	0	0	X	X
37	Dom Pedrito 2	0	0	0	X	X
38	Dom Pedrito 2	0	0	0	X	X
39	Dom Pedrito 2	0	0	0	X	X
40	Eldorado do Sul 1	0	1	1	1	1
41	Eldorado do Sul 1	0	1	1	1	1
42	Eldorado do Sul 1	0	0	0	X	X
43	Eldorado do Sul 2	0	0	0	X	X
44	Eldorado do Sul 2	0	0	0	X	X
45	Eldorado do Sul 2	0	0	0	X	X
46	Eldorado do Sul 3	0	1	0	X	X
47	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
48	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
49	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
50	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
51	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
52	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
53	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
54	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
55	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
56	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
57	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
58	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
59	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
60	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
61	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
62	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
63	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
64	Eldorado do Sul 3	0	0	0	X	X
65	Erechim	0	1	1	1	1
66	Erechim	0	1	1	1	1
67	Erechim	0	1	1	1	1
68	Erechim	0	1	1	1	1
69	Estância Velha	1	1	1	1	1
70	Estância Velha	1	1	1	1	1
71	Estância Velha	1	1	1	1	1
72	Estância Velha	1	1	1	1	1

AMOSTRA	MUNICÍPIO	LEITE			SORO	
		ISOLAMENTO	TAL	AAT	SAL	MERCAPTO
73	Estância Velha	1	1	1	1	1
74	Estância Velha	0	1	1	1	1
75	Estância Velha	0	1	1	1	1
76	Estância Velha	0	1	1	1	1
77	Estância Velha	0	1	1	1	1
78	Estância Velha	0	1	1	1	1
79	Estância Velha	0	1	1	1	1
80	Estância Velha	0	1	1	1	1
81	Estância Velha	0	1	1	1	1
82	Estância Velha	0	1	1	1	1
83	Estância Velha	0	1	1	1	1
84	Estância Velha	0	1	1	1	1
85	Estância Velha	0	1	1	1	1
86	Estância Velha	0	1	1	1	1
87	Estância Velha	0	1	1	1	1
88	Estância Velha	0	1	1	1	1
89	Estância Velha	0	0	0	X	X
90	Estância Velha	0	0	0	X	X
91	Estância Velha	0	0	0	X	X
92	Estância Velha	0	0	0	X	X
93	Estância Velha	0	0	0	X	X
94	Estância Velha	0	0	0	X	X
95	Estância Velha	0	0	0	X	X
96	Estância Velha	0	0	0	X	X
97	Estância Velha	0	0	0	X	X
98	Estância Velha	0	0	0	X	X
99	Estância Velha	0	0	0	X	X
100	Estância Velha	0	0	0	X	X
101	Estância Velha	0	0	0	X	X
102	Estância Velha	0	0	0	X	X
103	Estância Velha	0	0	0	X	X
104	Estância Velha	0	0	0	X	X
105	Estância Velha	0	0	0	X	X
106	Estância Velha	0	0	0	X	X
107	Estância Velha	0	0	0	X	X
108	Estância Velha	0	0	0	X	X
109	Estância Velha	0	0	0	X	X
110	Estância Velha	0	0	0	X	X
111	Estância Velha	0	0	0	X	X
112	Estância Velha	0	0	0	X	X
113	Estância Velha	0	0	0	X	X
114	Estância Velha	0	0	0	X	X
115	Estância Velha	0	0	0	X	X
116	Estância Velha	0	0	0	X	X
117	Estância Velha	0	0	0	X	X
118	Estância Velha	0	0	0	X	X
119	Estância Velha	0	0	0	X	X
120	Estância Velha	0	0	0	X	X
121	Estância Velha	0	0	0	X	X
122	Estância Velha	0	0	0	X	X
123	Estância Velha	0	0	0	X	X
124	Estância Velha	0	0	0	X	X
125	Estância Velha	0	0	0	X	X
126	Estância Velha	0	0	0	X	X
127	Estância Velha	0	0	0	X	X
128	Estância Velha	0	0	0	X	X

AMOSTRA	MUNICÍPIO	LEITE			SORO	
		ISOLAMENTO	TAL	AAT	SAL	MERCAPTO
129	Estância Velha	0	0	0	X	X
130	Estância Velha	0	0	0	X	X
131	Estância Velha	0	0	0	X	X
132	Estância Velha	0	0	0	X	X
133	Estância Velha	0	0	0	X	X
134	Estância Velha	0	0	0	X	X
135	Estância Velha	0	0	0	X	X
136	Estância Velha	0	0	0	X	X
137	Estância Velha	0	0	0	X	X
138	Estância Velha	0	0	0	X	X
139	Estância Velha	0	0	0	X	X
140	Estância Velha	0	0	0	X	X
141	Estância Velha	0	0	0	X	X
142	Estância Velha	0	0	0	X	X
143	Estância Velha	0	0	0	X	X
144	Estância Velha	0	0	0	X	X
145	Estância Velha	0	0	0	X	X
146	Estância Velha	0	0	0	X	X
147	Estância Velha	0	0	0	X	X
148	Estância Velha	0	0	0	X	X
149	Estância Velha	0	0	0	X	X
150	Estância Velha	0	0	0	X	X
151	Estância Velha	0	0	0	X	X
152	Estância Velha	0	0	0	X	X
153	Estância Velha	0	0	0	X	X
154	Estância Velha	0	0	0	X	X
155	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
156	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
157	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
158	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
159	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
160	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
161	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
162	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
163	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
164	Frederico Westphalen	0	0	0	X	X
165	Gravataí 1	0	1	0	X	X
166	Gravataí 1	0	0	0	X	X
167	Gravataí 1	0	0	0	X	X
168	Gravataí 2	0	0	0	X	X
169	Gravataí 2	0	0	0	X	X
170	Ijuí 1	0	1	0	X	X
171	Ijuí 1	0	0	0	X	X
172	Ijuí 1	0	0	0	X	X
173	Ijuí 1	0	0	0	X	X
174	Ijuí 1	0	0	0	X	X

AMOSTRA	MUNICÍPIO	LEITE			SORO	
		ISOLAMENTO	TAL	AAT	SAL	MERCAPTO
175	Ijuí 2	0	0	0	X	X
176	Ijuí 2	0	0	0	X	X
177	Ijuí 2	0	0	0	X	X
178	Ijuí 2	0	0	0	X	X
179	Ijuí 2	0	0	0	X	X
180	Nova Bassano	1	1	1	1	1
181	Nova Bassano	1	1	1	1	1
182	Nova Bassano	1	1	1	1	1
183	Nova Bassano	1	1	1	1	1
184	Nova Bassano	1	1	1	1	1
185	Nova Bassano	1	1	1	1	1
186	Nova Bassano	1	1	1	1	1
187	Nova Bassano	1	1	1	1	1
188	Nova Bassano	1	1	1	1	1
189	Nova Bassano	1	1	1	1	1
190	Nova Bassano	0	1	1	1	1
191	Sentinela do Sul	0	1	0	X	X
192	Sentinela do Sul	0	1	0	X	X
193	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
194	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
195	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
196	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
197	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
198	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
199	Sentinela do Sul	0	0	0	X	X
200	Viamão 1	0	1	1	1	1
201	Viamão 1	0	0	0	X	X
202	Viamão 2	0	1	1	1	1
203	Viamão 2	0	0	0	X	X
204	Vila Maria	0	1	1	1	1
205	Vila Maria	0	1	1	1	1
Total	20 municípios	15	48	43	43	42

0 = negativo; 1 = positivo; X = não realizado.