



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

REYLAN DELANO ROCHA ALENCAR

**BRUCELOSE: *EPIDEMIOLOGIA* E FATORES DE RISCO
DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE
MARANHENSE**

SÃO LUÍS

2016

REYLAN DELANO ROCHA ALENCAR

**BRUCELOSE: *EPIDEMIOLOGIA* E FATORES DE RISCO
DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE
MARANHENSE**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal CMCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof^{Dr} Ferdinan Almeida Melo

SÃO LUÍS

2016

Rocha Alencar, Reylan Delano.

BRUCELOSE: EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO
DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE
MARANHENSE

70f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal,
Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

1.Brucelose. 2.Fêmeas bovinas. 3.Saúde pública. 4. Zoonoses. I.Título

CDU: 00

REYLAN DELANO ROCHA ALENCAR

**BRUCELOSE: *EPIDEMIOLOGIA* E FATORES DE RISCO
DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE
MARANHENSE**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal CMCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

Aprovada em: 11/03/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan

Almeida Melo – Orientador
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos – 1º Membro
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Prof. Dr. José Gomes Pereira – 2º Membro
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Ao Deus supremo...

*À minha amada família: Meus pais
Tadeu e Auxiliadora, e minha segunda mãe
Graça, meus mais valiosos presentes de
vida, que me dão força, segurança
e coragem para nunca desistir
dos meus sonhos...*

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de concluir meu mestrado;

Aos meus pais, Tadeu Alencar e Maria Auxiliadora. Assim como, a minha segunda mãe Maria da Graça, pelo incentivo e apoio dado durante todos os momentos.

Aos meus familiares em especial a minha avó, dona Etelvina;

Ao meu orientador, Doutor Ferdinan Almeida Melo, por ter acreditado em mim e ter aberto as portas do mestrado me aceitando como orientando. Além de orientador, um ótimo amigo e conselheiro;

À DraGeovania Braga, pelo aprendizado, apoio e disponibilidade para sempre ajudar nos momentos difíceis;

Ao professor Hamilton Pereira, por ter contribuído significativamente com o meu projeto, sempre somando com seus conhecimentos e auxiliando nos momentos importantes na execução do projeto;

Aos meus amigos da sala da justiça, Thayane, Almerinda, Paulo, Emerson, Itala, Karol, Renata, Isadora, Danilo que sempre estiveram presentes em minha jornada;

Aos meus amigos Iralberth, Ronilso Sousa, Kaio Campelo, Jonas Neto, Junior, Marccone, Thalís, Fernando, Wanderson, Cássio, Natanael, Diego, Thiago, pela amizade, a qual tenho grande apreço. Em especial para o meu irmão Ronilso Sousa, sempre esteve disposto a colaborar e participar do projeto contribuindo com toda sua experiência a campo nas coletas;

Ao motorista do Mestrado em Ciência Animal/UEMA, Seu Agnaldo, por todas as viagens de suma importância para realização das coletas a campo. E obviamente, por sua amizade também;

A minha namorada, Lohayne Melo, pelo seu companheirismo a todo momento;

À Universidade Estadual do Maranhão por viabilizar minha formação profissional intelectual;

Aos meus amigos que conquistei ao longo da minha trajetória na veterinária da UEMA de São Luís. Em especial, Anderson, Priscila, Leandro, Leandro Residente, Rodrigo; Doutoranda Alessandra Lima;

A todos os graduandos que de maneira direta ou indireta contribuíram para conclusão desta etapa em minha vida. Em especial, a bolsista do projeto Larissa Pimentel e ao estagiário Mateus Fontes;

A todos os funcionários da UEMA/São Luís em especial os do prédio de Medicina Veterinária, responsáveis pela manutenção e funcionamento das atividades acadêmicas;

A Dona “Tió”, senhora da cidade operária que está sempre de braços abertos para todos que estão vindo de fora estudar na capital, acolhendo e tratando como se fossem próprios filhos dela, sempre também com muito carinho e amor. Muito grato por tudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa;

A minha amiga e médica veterinária Rayane Barros, pela colaboração e execução das atividades a campo;

Ao Programa de Mestrado em Ciência Animal na Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade. A todos os professores, sempre tão dispostos a ensinar, que vieram de seus respectivos estados com tanta energia, alegria, profissionalismo e dedicação;

À AGED, pela colaboração e apoio, seja com a liberação de informações a respeito dos produtores rurais até com concessão de antígenos para os testes laboratoriais;

A todos produtores que concordaram em participar do projeto;

A todas as fêmeas bovinas que fizeram parte do projeto;

Muito obrigado a todos que contribuíram e me apoiaram durante a realização deste trabalho, durante o curso e durante toda minha trajetória.

RESUMO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição universal. Acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho. Diante das informações apresentadas, a obtenção e publicação dos resultados específicos da região Sudoeste Maranhense, através do estudo soroepidemiológico na detecção da *Brucella abortus* no rebanho bovino assume grande importância, como parte do PNCEBT, na busca de evidenciar uma realidade de forma qualificável e quantificável, além de buscar informações que possam contribuir para a adoção e/ou intensificação de medidas de controle. O estudo foi realizado em 30 propriedades localizadas na zona rural dos municípios de Imperatriz, Davinópolis, Ribamar Fiquene, Porto Franco, Buritirana e Governador Edson Lobão que fazem parte do Sudoeste do Estado do Maranhão. Foram coletadas amostras de Amarante, Porto Franco e São João do Paraíso também devido a proximidade e grande fluxo de animais em trânsito. Foram coletados 550 soros bovinos distribuídos em 30 propriedades na área de estudo no período de setembro de 2014 a julho de 2015. Assim, obteve-se um resultado de 51 amostras positivas no teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), 37 amostras positivas para o teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol e 47 amostras positivas no ELISA Indireto, e 34 amostras positivas no Teste de Polarização Fluorescente.

Palavras-chave: Brucelose; Fêmeas bovinas; Saúde pública; Zoonoses.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*. Produces characteristic infection in animals may infect humans. Being a universal distribution zoonosis. Has serious health problems and significant economic losses. In humans, the clinical manifestation is responsible for partial or total incapacity for work. On the information presented, obtaining and publishing the specific results of the Southwest Maranhão region through seroepidemiological study in the detection of *Brucella abortus* in the herd of cattle is very important as part of PNCEBT in the search for evidence a fact of qualifiable and quantifiable manner, in addition to seeking information that might contribute to the adoption and / or intensification of control measures. The study was conducted in 30 properties located in rural areas of the municipalities of Imperatriz, Davinópolis, ribamarfiquene, Freeport, Buritirana and Governor Edson Lobão that are part of the State of Maranhão Southwest. Amarante samples were collected from, Porto Franco and São João do Paraíso also due to closeness and large flow of animals in transit. They collected 550 bovine sera in 30 properties in the study area from September 2014 to July 2015. Thus, we obtained a result of 51 positive samples in the screening test antigen acidified Buffered (AAT), 37 positive samples for confirmatory testing of 2-Mercaptoethanol, 47 positive samples Indirect ELISA, and 34 positive samples for testing Fluorescence Polarization.

Keywords: Brucellosis; Cows; Public health; Zoonoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa dos municípios amostrados da região Sudoeste Maranhense.	39
-------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cidades visitadas correspondentes a Região Sudoeste do Maranhão, bem como, o número de amostras/propriedades, Maranhão 2015.....	41
Tabela 2 -	Frequência de bovinos reagentes para <i>Brucellaabortus</i> nos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e ELISA Indireto, por município do Sudoeste Maranhense.....	44
Tabela 3 -	Frequência de bovinos reagentes para <i>Brucellaabortus</i> nos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), por município do Sudoeste Maranhense.....	45
Tabela 4 -	Frequência de bovinos reagentes para <i>Brucellaabortus</i> nos testes de 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Teste de Polarização de Fluorescência, por município do Sudoeste Maranhense.....	47
Tabela 5 -	Frequência de foco da <i>Brucellaabortus</i> no teste Antígeno Acidificado Tamponado e 2-Mercaptoetanol, por município da região Sudoeste Maranhense, 2015.....	48
Tabela 6 -	Análise univariada dos possíveis fatores de risco associado a brucelose em municípios da região Sudoeste Maranhense.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Variáveis qualitativas analisadas.....	42
Quadro 2 -	Distribuição das Unidades Regionais com seus respectivos municípios, bem como, o número de amostras/propriedades, Maranhão, 2015.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME	Dois Mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
AGED-MA	Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão
B-19	Brucelina. Vacina contendo cepa de <i>Brucellaabortus</i> atenuada
ELISA	Enzyme-linkedimmunosorbentassay
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação Polimerase em Cadeia
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal
TPF	Teste de Polarização Fluorescente

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Histórico	19
2.2	Etiologia	19
2.3	Patogenia	21
2.4	Imunidade	23
2.5	Epidemiologia	26
2.6	Importância para saúde pública	27
2.7	Sinais clínicos	27
2.8	Diagnóstico	28
2.8.1	Testes sorológicos	28
2.8.1.1	Antígeno Acidificado Tamponado	28
2.8.1.1.2	Mercaptoetanol	29
2.8.1.1.3	Teste de Elisa Indireto	29
2.8.1.1.4	Teste de Polarização de Fluorescência	29
2.9	Controle e profilaxia	30
3.	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4.	RESULTADOS	33
4.1	CAPÍTULO I	34
4.1.1	ARTIGO I	35
	Epidemiologia e fatores de risco da <i>Brucella abortus</i> : no rebanho bovino do Sudoeste Maranhense	36
	INTRODUÇÃO	38
	MATERIAL E MÉTODOS	39
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	52
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE	62
	ANEXO	70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2006).

Deve notar-se que *Brucella* têm preferências de acolhimento definidas, por exemplo, *B. melitensis* infecta principalmente caprinos, mas *B. abortus* o hospedeiro principal é o bovino e, portanto, a epidemiologia do agente pode ajudar a controlar infecção em ovinos e bovinos, bem como a humana (SALEHI et al., 2006).

Nos bovinos e bubalinos, acomete, de modo especial, o trato reprodutivo, gerando perdas diretas devido, principalmente a abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. No Brasil, estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Em 1975, foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5% e Norte, 4,1% (BRASIL, 2004).

A principal via de infecção de *B. abortus* no bovino é a oral, sendo também muito importante a via aerógena. Uma grande quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o aborto e o parto de animais infectados. Estes animais continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias. Esta enorme quantidade de bactérias eliminadas durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à grande resistência de *B. abortus* no ambiente, é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis. Hábitos dos bovinos como lambem e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas, favorecem a transmissão da brucelose (IDAF, 2011).

Não existe nenhum tratamento que apresente uma garantia de eficiência. O controle da brucelose é baseado na higiene, aplicação de vacinas e eliminação dos animais reagentes. Todos estes três controles são muito importantes e o descuido em qualquer um deles poderá tornar o trabalho de erradicação muito difícil (EMBRAPA, 2000).

O estado do Maranhão possui um rebanho bovino total de 7.403.542 (BRASIL, 2012), na qual a prevalência aparente de focos de brucelose está estimada em torno de 11,42% e a prevalência aparente da doença em fêmeas bovinas com idade superior ou igual a 24 meses está estimada em aproximadamente 2,52% (BORBA, 2012).

A Região do Sudoeste Maranhense foi criada por uma Lei Complementar Estadual nº 89 de 2005 e é formada pelos municípios de Imperatriz, João Lisboa, Senador La Rocque, Buritirana, Davinópolis, Governador Edison Lobão, Montes Altos e Ribamar Fiquene (EMPLASA, 2005).

De acordo com Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (2014), a população bovina leiteira da região sudoeste está estimada em 155.633 animais.

Diante das informações apresentadas, a obtenção e publicação dos resultados específicos da região Sudoeste Maranhense, através do estudo soroepidemiológico na detecção da *Brucella abortus* no rebanho bovino assume grande importância, como parte do PNCEBT, na busca de evidenciar uma realidade de forma qualificável e quantificável, além de buscar informações que possam contribuir para a adoção e/ou intensificação de medidas de controle e na redução de prejuízos socioeconômicos causados pela doença na referida região, pois não existe investigação que comprove a existência desta enfermidade.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Historicamente, a brucelose já era de conhecimento da humanidade desde o século V a.C., contudo, não era definida como uma patologia específica. Posteriormente, um relato mais próximo da identificação da patologia foi em 1863 (TÔLEDO, 2006).

Sua identificação de fato aconteceu em 1.897 por Bang e devido a isso, ela também possui a sinonímia de mal de Bang. O agente que comumente provoca a brucelose e a *Brucella abortus*, na qual trata-se de uma bactéria altamente infecciosa e que contaminar o hospedeiro através da ingestão de alimentos contaminados ou o contato direto da pele lesada com o material contaminado (BELVICQUIA, 2008).

Já no Brasil, o primeiro relato de brucelose humana foi em 1913, onde Gonçalves Carneiro relatou o primeiro caso, e no ano subsequente, Danton Seixas realizou o primeiro diagnóstico clínico da brucelose bovina, no estado do Rio Grande do Sul (SOLA et al., 2014).

Muitos estudos foram realizados no Brasil entre 1950 e 1974 e no ano posterior, 1975, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizou o primeiro inquérito sorológico a nível nacional (JÁCOMO, 2014)

2.2 Etiologia

O gênero *Brucella* consiste em pequeno, estacionário de bacilos gram-negativos aeróbicos, de crescimento lento que não tem cápsulas ou esporos de formulário. Ao contrário de muitas outras bactérias, o seu genoma é constituído por dois cromossomas circulares e plasmídeos falta (MICHAUX-CHARACHON, 1997). O metabolismo oxidativo são baseadas no uso de nitratos como aceitadores de electrões. Eles são catalase positiva e oxidase, não atacam a gelatina ou leite modificado e geralmente não fermentar os açúcares (WILFERT, 1986).

O gênero *Brucella* inclui seis espécies diferentes: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B.* e *B. marisneotomae* (CLOECKAERT, 2001). Destes, os primeiros quatro podem infectar os seres humanos.

Com base no aparecimento de colónias obtidas em meio sólido, diferentes espécies de *Brucella* são geralmente classificados como suaves (S) ou rugosa (R). Entre os primeiros estão *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. neotomae* e dentro do segundo *B. ovis* e *B. canis* (CARDEAL, 1995).

As estirpes de *Brucella* em fase lisa são mais virulentos e ultra-estrutura é semelhante à de algumas *Enterobacteriaceae* (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* *landau*,

Pseudomonas maltophilia, *Escherichia coli*) (CORBEL, 1983), embora existam algumas diferenças nas características da sua membrana externa (ME)

A ME de *Brucella* é rica em fosfatidilcolina ao contrário pertencente a enterobactérias associado a ele, que é rico em fosfatidiletanolamina.

A mais abundante e melhor estudada é a componente de LPS, também conhecido como endotoxina. Três regiões nela distinguem-se: lípido A, inserido no folheto exterior da membrana, um oligossacárido intermediário chamado núcleo de polissacárido e O (OSP), também conhecida como a cadeia de O, ausentes ou presentes com alguns resíduos no LPS - R.

Os LPS-S de formas suaves consiste de lípido A, do núcleo de polissacárido e O (OSP). O LPS-R constitui a cadeia robusto carece de O ou é reduzida a muito pouco desperdício.

O lípido A é um glicolípido contendo glucosamina e diaminoglucosa. Os seus grupos amino e hidroxilo presentes ácidos gordos de comprimento de cadeia substituições variadas. O núcleo contém glucose, manose e ácido 3, octulosónico desoxi-D-2-mão (KDO) e não contém fosfatos ou heptoses. O quinovosamina está presente no núcleo do LPS-S, mas não em LPS-R. A PSO é a parte mais distal do LPS. Ele é um homopolímero linear composto de N-formil-N resíduo perosamina (4,6-didesoxi-4-formamido- α D-manopiranosilo). A união entre estes resíduos podem ser de dois tipos: 1-2 ou 1-3, o que diferencia duas configurações alternativas, A e M, de grande importância na determinação Biovars, que são estabelecidos a partir de de resíduos alternados nas junções entre o PSO.

A *Brucella* contém outro polissacárido nativo conhecido (HN), que é quimicamente idêntico ao da cadeia de O, mas não está ligado para o núcleo (6). Tem descrita uma terceira polissacárido conhecido como poli B, que é obtida a partir da estirpe de *B. melitensis* mutante rugosa fase 115 por meio de tratamento com 0,2 M de ácido tricloroacético e alguns autores como sendo quimicamente equivalente para HN (7) .

As proteínas da membrana externa (OMPs ou PMA) estão intimamente associados com LPS. Entre estas proteínas são chamados anciãos, que são classificadas em três grupos de acordo com seus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) e Grupo 3 (25-27 e 31- 34 kDa) (8) (9) e são expostos na membrana exterior, mas são menos acessíveis do que as estirpes lisas bruto, devido à obstrução estérica causada por cadeias ou o LPS do primeiro. Outras proteínas de membrana menos abundantes. Ao empregar anticorpos monoclonais foram identificados são chamadas proteínas menores, lipoproteínas e alguns deles (10).

Proteínas citoplasmáticas de bactérias do gênero *Brucella* são específicos para esse gênero e mais são compartilhados por todas as espécies (11). Algumas destas proteínas são de interesse de diagnóstico, tais como A2 glicoproteína resistente ao calor (12), uma proteína de 17 kDa, envolvidos na síntese de riboflavina, que aparece na fase activa de infecção (13) e a proteína periplasmática BP26 (14). Todas estas proteínas são parte de um antígeno denominado CP, utilizado no ELISA.

2.3 Patogenia

Brucella spp são bactérias intracelulares facultativas que têm a capacidade de evitar o mecanismo de morte e proliferam dentro dos macrófagos, semelhante a outros agentes patogénicos intracelulares.

Para ser um agente infeccioso bem sucedido, *Brucella* requer quatro etapas: adesão, invasão, criação e divulgação dentro do hospedeiro opsonizado e não opsonizado. *Brucella* podem infectar macrófagos. Assim indicando anfitrião contato direto célula que permite aderência e invasão, bem como anticorpo ou complemento phagocytises mediadas. Nos macrófagos. *Brucella* células sobreviver e se multiplicar, inibindo a fusão fagossoma-lysosome. Finalmente, as bactérias acumuladas são divulgados às outras células hospedeiras (KO, 2003).

A capacidade de *Brucella* spp. para causar a doença requer alguns passos críticos durante a infecção. A *Brucella* spp. pode invadir células epiteliais do hospedeiro, permitindo a infecção por superfícies mucosas: células M no intestino foram identificadas como um portal de entrada para *Brucella* spp.. Uma vez que a *Brucella* tenha invadido, geralmente através do aparelho digestivo ou trato respiratório, são capazes de sobreviver intracelularmente dentro das células fagocitárias ou células hospedeiras não fagocitárias (POESTER, 2013).

Depois de infectar o hospedeiro, o patógeno torna-se sequestrado no interior das células do sistema reticuloendotelial. O mecanismo pelo qual *Brucella* entra nas células e evita a morte intracelular eo sistema imune do hospedeiro é um assunto de muita pesquisa e debate.

Diversos estudos sobre os factores de virulência são dirigidos para os principais componentes da membrana externa. A membrana externa contém lipopolissacáridos (LPS), que é o principal factor de virulência de *Brucella*. Ele possui uma peculiares LPS não clássicos, em comparação com os LPS clássicos de Enterobactérias, tais como *Escherichia coli* (LAPAQUE, 2005).

LPS suave tem um papel na entrada e evasão imune celular da célula infectada. É também altera a capacidade da célula infectada para apresentar antígenos estranhos ao sistema de apresentação de antígenos de MHC de classe II, assim, prevenir o ataque e matando a célula infectada com a ajuda do sistema imune (ARAYA, 1989), o LPS tem três domínios: Lípido A, o oligossacárido do núcleo, e o O-antígeno. O O-polissacárido do tipo liso *Brucella* LPS é um homopolímero não ramificada de 1-2 ligado 4, 6-didesoxi-4 formamido e α -D manopiranosilo, geralmente com um comprimento médio de cadeia de 96 a 100 subunidades de glicosilo (BUNDLE, 1989).

O O-polissacárido está ligado ao polissacárido núcleo composto por manose, glucose, ácido 2-amino-2, 6-didesoxi-D-glucose, 2-amino-2-desoxi-D-glucose, 3-desoxi-D-mano-2 ácido -octulosonic (KDO) e açúcares não identificados. (O lípido A ligado ao núcleo de polissacárido contém 2, 3-diamino-2,3-didesoxi-D-glucose como o esqueleto e de cadeia longa amide- e ligados a éster saturado (C 16: 0 a C 18: 0) e hidroxilado ácidos graxos (MONERO, 1987).

A heterogeneidade da enterobactérias é conhecida por estar relacionada com o comprimento do seu O-polissacárido e diferentes substituições químicas em que o oligossacárido do núcleo e lípido-A (FREER, 1995) no lípido enterobacteriano A, o grau de heterogeneidade depende das diferentes combinações que os tipos amide- e de ácido gordo, fosfatos, açúcares neutros, etanolamina-éster ligado, e diferentes de açúcares aminados backbone ocorrem na molécula, (RAETZ, 1990) que, em *Brucella* lípido A, o grau de heterogeneidade depende principalmente de vários ácido gordo substituições. Há uma ausência de componentes de resíduos de esqueleto e acil-oxiacilo ligados a éster em *Brucella* lípido A, em comparação com enterobactérias lípido A. (DIAZ, 1993). Determinação da heterogeneidade *Brucella* LPS é importante para fins práticos, uma vez que o antígeno é mais relevante durante infecção e vacinação. As seqüências do genoma de *B. melitensis*, *B. suis*, e *B. abortus* se tornaram disponíveis recentemente (HALLING, 2005). Eles são semelhantes em seqüência, organização e estrutura. Genômica comparativa fornece uma visão sobre os aspectos da *Brucella* virulência que só foi suspeitas anteriormente. Usando a seqüência completa do genoma de *B. melitensis*, Dricot et al. (DRICOT, 2004) gerou um banco de dados de proteínas ORFs codificadoras e construiu uma biblioteca ORFome de 3091 clones entrada de gateway, cada um contendo uma ORF definido. A seqüência do genoma do *B. melitensis* 16M cepa contém 3.294.935 bp, que é distribuída ao longo de dois cromossomos circulares de 2.227.144 pb e 77.787 bp, codificação 3,197 ORF. O genoma de *B. abortus* biovar (estirpe 9-941) tem 3,3 Mb compostas de dois cromossomos circulares de

2.124.242 (ChrI) e 1.162.780 bp (Chr II) (CARDOSA, 2006). O genoma de *B. suis* é um genoma 1330 que consiste em dois cromossomos circulares de 2,107,7892 pb e 1.207.381 bp. (VIZCAINO, 2001).

O genoma de *B. abortus* partilha mais fragmentos com *B. suis* e *B. melitensis*, que *B. suis* e *B. melitensis* ver com o outro. A maioria dos genes estudados estão envolvidos em *Brucella* biossíntese e O-cadeia síntese semelhante persominesynthetase (PER), manosil-transferase (wbkA, WbdA, B, C), fosfoglucomutase (PGM), Tipo de transportadores ABC (W 2m, W 2t) , e manose (mana, B, C) .O BvrR / BvrS sistema de detecção do gene actua como uma cascata de fosforilação de proteínas para modular a expressão de chave, e estes factores-chave estão envolvidos na ligação e penetração da célula. Este sistema tem um efeito sobre a expressão de proteínas da superfície celular Omp 25 (Omp3a) e Omp 229 (Omp3b) (LOPEZ, 2002).

Esta expressão celular alterada das proteínas de superfície permite *Brucella* para se ligar a penetrar e a via lisossomal. Um sistema de secreção de tipo IV (Vir B) transporta selectivamente proteínas e macromoléculas através das membranas e é essencial para a sobrevivência intracelular, no caso de *Brucella*. Ela também ajuda a aderência da bactéria para a entrada na célula hospedeira e célula. [31] Um grande número de mutantes atenuados, com defeitos estruturais no seu lipopolissacárido, confirmam a importância desta molécula em *Brucella* virulência. [32] da proteína de choque térmico 60 (Hsp60), um membro da família de GroEL de chaperoninas, é expressa na superfície da célula de tipo selvagem *Brucella* spp, mas não em mutantes virB. Hsp60 parece desempenhar um papel na adesão celular através da ligação a uma molécula do prião celular chamado PrPr. À medida que a exportação de Hsp60 é VirB-dependente, foi postulado que a Hsp60 pode, de facto, ser um factor de virulência. [33] Uma vez que o organismo se liga aos macrófagos, as vesículas de internalização que os endossomas se fundem com levá-la para cima. Os endossomas são lisadas por acidificação. Esta acidificação é pensado para induzir a expressão Vir B. [34]

2.4 Imunidade

Com base na sinalização celular iniciada após activação TLR, é evidente que o MyD88 proteína desempenha um papel central na resposta imune inata contra vários agentes patogénicos. Na verdade, foi demonstrado que MyD88 - / - ratos são ineficientes para controlar *B. abortus* infecção e a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos é completamente revogada (Weiss et al., 2005). A susceptibilidade de MyD88 - / - ratos para *B. abortus* infecção foi mais correlacionado com a maturação DC prejudicada e falta de síntese

de IL-12 pelo nosso grupo (Macedo et al., 2008). Além disso, a activação DC durante a infecção estimula as células T para produzir IFN- γ , que desempenha um papel essencial controlar *B. abortus* infecção (Brandão et al., 2012). IRAQUE-4, uma outra proteína centro de mediação de sinalização celular em cima da ativação TLR, foi correlacionada com a depuração eficiente de *B. abortus*, em ratinhos, mas não em fases posteriores da infecção. Semelhante a MyD88 - / -, macrófagos e DC derivadas de IRAK4 - / - murganhos são incapazes de produzir citocinas inflamatórias em resposta a *B. abortus* (Oliveira et al., 2011). O papel central atribuído à MyD88 e IRAQUE-4 proteínas pode sugerir a participação de TLRs durante o controle de *B. abortus* infecção. Inicialmente, foi mostrado que o TLR2 desempenha nenhum papel no controlo *B. abortus* infecção em ratinhos. Em relação TLR4, existem algumas controvérsias no campo. A produção de TNF- α pelos macrófagos derivados de TLR2 - / - e TLR4 - / - ratos é reduzida em *B. abortus* infecção. Além disso, demonstrou-se que o *B. abortus* não LPS não-canônico não exibir uma actividade imunestimulante potente (Weiss et al., 2005). Adicionalmente, foi descrita uma produção dependente de TLR4 de citocinas inflamatórias induzidas pela proteína de membrana externa unlipidated (OMP) 16 (L-OMP16) derivada de *B. abortus* (Pasquevichet al., 2010). Além disso, macrófagos peritoneais murinos produzem TNF- α e IL-6, através da activação de TLR2 por infecção com *B. abortus* ou quando estimulados com o seu lipoproteína L-OMP-19 (Delpino et al., 2012). Este resultado confirma a ideia de que as lipoproteínas em vez de LPS são os principais mediadores da resposta inflamatória induzida por *B. abortus* (Giambartolomeiet al., 2004). Assim, TLR2 reconhece *B. abortus* componentes que induzem a produção de citocinas inflamatórias. No entanto, este receptor desempenha nenhum papel na resistência a ratinhos *B. abortus* infecção in vivo. Além disso, foi correlacionada com TLR9 adequada *B. abortus* controle de infecções em murganhos, pelo menos nas fases iniciais da infecção (em duas semanas). Além disso, a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos e DC derivadas de TLR9 - / - ratos são parcialmente reduzido após estimulação com morta pelo calor *B. abortus* (HKBa) (Macedo et al., 2008).

A produção de mediadores imunes após a activação de TLR depende de sinalização intracelular de MAPK, que incluem as quinases regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1 / 2), c-Junquinases amino-terminal (JNK) e p38 (Cargnello e Roux, 2011). Anteriormente, foi demonstrado que a *B. abortus* RB51 mutante rugosa e tipo selvagem suave S2308 estirpe induzir a fosforilação de ERK1 / 2 e p38. No entanto, a activação destas MAPK é mais proeminente quando a estirpe bruto foi usada como estímulo (Jimenez de Bagüés et al., 2005). Além disso, o nosso grupo mostraram que a ERK1 / 2 e p38, bem como p65 de NF-

kbfosforilação é profundamente deficientes em IRAK-4 - / - e MyD88 - / - macrófagos activados por *B. abortus* (Oliveira et al., 2011). Claramente, a exigência de MyD88 e IRAK-4 na activação de MAPK argumenta à participação dos TLRs na sinalização celular em cima *B. abortus* infecção. De facto, foi demonstrado que provoca HKBa ERK1 / 2 e p38, através da activação da fosforilação de TLR2 em DCs. Nesse caso, a p38 mas não ERK1 / 2 activação está correlacionada com HKBa fagocitose e produção de IL-12 (Zhang et al., 2012). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que *B. abortus* pode ativar diversos receptores inatos que culminam na ativação sinalização celular e produção de citocinas.

A primeira observação de que *Brucella* induz IFN tipo I foi feita por Huang e colegas (2005), quando o IFN- α foi detectado no soro de ratinhos de tipo selvagem injectadas com HKBa e o nível foi marcadamente reduzida na TLR9 - / - ratos soro, demonstrando que HKBa induz IFN- α de um modo dependente-TLR9. Além disso, tem mostrado que *B. abortus* é capaz de induzir o IFN- β em DCs (Salcedo et al., 2008). O nosso grupo tem revelado recentemente um papel interessante de IFN tipo I durante *B. abortus* infecção. A ausência de IFN tipo I sinalização reforço da protecção de acolhimento para *B. abortus* infecção desde RIFNA - / - mostraram-se mais resistentes à infecção do que os ratinhos de tipo selvagem. Além disso, o baço derivadas de *Brucella* infectados pelo RIFNA - / - ratos exibiram uma redução drástica na apoptose do baço em comparação com o tipo selvagem controla semelhante a *L. monocytogenes* resultados apresentados por Carrero et al. (2006). Camundongos sem IFNAR foram mais resistentes à *B. abortus* infecção e exibido menos lesões apoptóticas bem como a expressão reduzida do gene de pró-apoptótica de TRAIL do que as suas contrapartes de tipo selvagem especulando que IFN tipo I melhora a sinalização imune de células de apoptose; portanto, fazendo com que o aumento da susceptibilidade a *B. abortus*. Além disso, demonstrou-se que *B. abortus* ADN é um componente bacteriano importante para induzir o IFN- β em macrófagos que ocorre na maior parte independente de TLRs. Surpreendentemente, IFN tipo I expressão por *B. abortus* ou o seu ADN foi dependente de MyD88, uma via intracelular observada em *Streptococcus* e *Bacillus anthracis* infecção mediada por um PRR desconhecido (Glomski et al., 2007; Gratz et al., 2008; Almeida et al., 2011). Por outro lado, demonstrou-se que a molécula do adaptador TRIF não desempenhou qualquer papel na indução de IFN tipo I ou in vivo de controle hospedeiro de *B. abortus*. Além disso, nós e outros grupos são intensivamente à procura de receptores citosólicos que são capazes de detecção de agentes patogénicos ácidos nucleicos libertados a partir de bactérias lisadas, ou do sistema de secreção bacteriana durante a infecção (Monroe et al., 2010).

2.5 Epidemiologia

As bruceloses são enfermidades de distribuição mundial ainda que haja países que as erradicaram como os nórdicos ou as mantêm controladas como os E.U.A., Canadá e a maioria dos países da Europa. Todas as espécies domésticas são sensíveis com a ressalva da adaptação, assim, *B. abortus* geralmente infecta bovinos, mas pode-se encontrá-la causando enfermidade em outros animais e o mesmo vale para as outras espécies de *Brucella* (BEVILACQUA, 2008).

Estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território brasileiro, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Em 1975, foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5% e Norte, 4,1% (BRASIL, 2006). A brucelose no homem é de caráter principalmente profissional, em que estão mais sujeitos à infectar-se as pessoas que trabalham diretamente com os animais infectados (tratadores, proprietários, veterinários) ou aqueles que trabalham com produtos de origem animal (funcionários de matadouros, laboratoristas). As últimas pesquisas de reagentes em matadouros, pela sorologia, indicam a prevalência da brucelose humana neste setor: Bahia em 1972, 10,58 % de reagentes; Belo Horizonte em 1984, 2,1 % e Maranhão 1995, 2,17% (COSTA, 1998).

Quanto à resistência, as espécies de gênero *Brucella* são bastante sensíveis aos desinfetantes comuns, como álcool, hipoclorito de sódio, fenol e formol, à luz e à dessecação; em cadáveres ou tecidos contaminados enterrados podem resistir vivos por um a dois meses em clima frio, mas morrem em 24h no verão ou regiões quentes. Apasteurização elimina as bactérias indesejáveis e, portanto, também a simples fervura (CORREA & CORREA, 1992). Em certas circunstâncias o microorganismo viverá semanas fora do corpo. A exposição à luz direta ao sol mata o microorganismo em poucas horas (SIEGMUND et al., 1981).

No Maranhão, Matos (2004), ao pesquisar brucelose pelo leite cru comercializado informalmente na cidade de São Luís/MA, encontrou uma taxa de 10% de reação em 20 amostras de leite “in natura” submetidos ao teste do anel do leite de diversos bairros de São Luís; Nascimento (2000) encontrou a prevalência de 1,06% da enfermidade em 565 búfalos criados em dois municípios do Estado do Maranhão; Moura (2008), ao realizar uma investigação epidemiológica da brucelose no município de São Domingos do Maranhão, coletou soros de bovinos de propriedades rurais e no abatedouro municipal e obteve as

prevalências de 2,50% e 2,56%, respectivamente. Enquanto Lopes (2003), avaliando a incidência de brucelose em bovinos abatidos em matadouros no município de São Luís - MA, encontrou a prevalência de 5,83% de bovinos reagentes e os municípios com maior índice de reações positivas foram Buriticupu - MA e Paulo Ramos – MA (PRAZERES, 2009).

2.6 Importância para a Saúde Pública

Além de sua grande importância na pecuária, a brucelose é uma importante zoonose para saúde pública (CORRÊA et al., 1992). É uma doença importante, mas de difícil diagnóstico porque sua sintomatologia é inespecífica (BRASIL, 2005).

São patogênicas para o homem, sendo a patogenicidade em ordem decrescente: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. É importante ressaltar que não há praticamente transmissão de homem a homem e seu reservatório são os animais (CORRÊA et al., 1992).

É considerada como uma doença profissional ou ocupacional (DOMINGUES et al., 2001), pois acomete fazendeiros, veterinários e açougueiros (BLOOD et al., 1991). Laboratoristas, ao manipular grandes massas bacterianas na produção de vacinas e antígenos, ou mesmo na rotina de diagnóstico direto, podem infectar-se através de soluções de continuidade da pele ou pelo contato com mucosas, sobretudo a conjuntiva e a mucosa respiratória (a inalação é uma eficiente forma de infecção) (BRASIL, 2005).

As principais fontes de infecção para o homem são: animais infectados (material contaminado de aborto, restos de placenta, auxílio ao parto, magarefes em abatedouros, especialmente com carnes de suínos em matadouros); alimentos (leite cru e seus derivados contaminados) e vacinas vivas atenuadas (casos de acidentes) (DOMINGUES et al., 2001). Carne crua com restos de tecidos linfáticos e o sangue de animais infectados podem conter microorganismos viáveis, e portanto, de igual modo representam risco para a população consumidora. É importante ressaltar que leite e carne submetidos a tratamento térmico, não traz risco à saúde pública (BRASIL, 2005).

2.7 Sinais clínicos

Os sinais clínicos predominantes em vacas gestantes é o aborto ou o nascimento de animais mortos ou fracos. Geralmente o aborto ocorre na segunda metade de gestação, causando retenção de placenta, metrite e, ocasionalmente, esterilidade permanente. É estimado que a brucelose cause perdas de 20 – 25% na produção leiteira, devido aos abortos e aos problemas de fertilidade. Os animais infectados antes da fecundação segundamente não apresentam sinais clínicos e podem não abortar. Após um ou dois abortos algumas

vacas podem não apresentar sinais clínicos, mas continuam a excretar as brucelas contaminando o meio ambiente. Elas são a origem da infecção para as novilhas. Outras ficarão totalmente incapacitadas para a reprodução (BELVICQUIA, 2008).

O feto, ao ser abortado, deixa retenção placentária e nas células cotiledonárias podem ser observadas imensas quantidades do agente; geralmente está um pouco edematoso, o que pode ser difícil de estimar; pode apresentar líquido soro-ganguinolento nas cavidades abdominal e torácica e quase sempre apresenta broncopneumonia que microscopicamente mostra predomínio amplo de macrófagos sobre o componente neutrófilo. Após o aborto a brucella tende a ser eliminada do útero, porém em muitos animais resta endometrite difusa de longa duração que interfere com a fertilidade e fecundidade das vacas. Em geral, por período de alguns meses é possível isolar brucelas do útero (CORREA & CORREA, 1992).

De acordo com CORREA & CORREA, (1992) nas fêmeas bovinas, os órgãos em que o agente da *Brucella abortus* permanece são no úbere e linfonodos mamários causando granulomatose, normalmente discreta, às vezes com presença de alguns gigantócitos do tipo Langhans. Pode ser localizada e isolada também nos linfonodos pélvicos e faríngeos e ocasionalmente no fígado e baço (BEVILACQUA, 2008).

Nos touros a infecção se localiza nos testículos, vesículas seminais e na próstata. A doença manifesta-se por orquite, que acarreta baixa de libido e infertilidade. Os testículos podem apresentar, também, degeneração, aderência e fibrose. Às vezes podem ser observados higromas e artrites (Riet-Correa et al, 1998).

2.8 Diagnóstico

2.8.1 Testes sorológicos

2.8.1.1 Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes de triagem: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel em Leite (TAL). O AAT é uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou ausência de IgG1. Nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, enquanto que, nessa prova, reagem somente os isotipos da classe IgG1. O pH acidificado da mistura soro-antígeno inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos.

2.8.1.2 Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)

É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos. Baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, com configuração pentamétrica, degradam-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo o animal ser considerado infectado.

2.8.1.3 Teste de Elisa Indireto (I-Elisa)

Existem vários protocolos de I-Elisa que têm apresentado bons resultados. Emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado com a peroxidase. Agentes quelantes (EDTA/EGTA) são utilizados para minimizar reações não específicas. O teste possui alta sensibilidade.

2.8.1.4 Teste de Polarização de Fluorescência (FPA)

O antígeno utilizado no teste é preparado com o polissacarídeo O, também denominado cadeia “O”, de *B. abortus*, conjugado com o isotiocianato de fluoresceína. A prova se fundamenta na comparação de velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação dos complexos anticorpo-antígeno conjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno conjugado isolado. Determina-se a velocidade de rotação das moléculas com o auxílio de um equipamento de iluminação por luz polarizada. Por meio da utilização de controles e de soro pré-titulado, é possível calcular a quantidade de anticorpos presente no

soro testado. O teste é concluído em poucos minutos; pode ser realizado em soro e leite e tem-se mostrado muito promissor para o diagnóstico de brucelose também em outras espécies.

2.9. Controle e profilaxia

As perdas econômicas advindas da brucelose, juntamente com o perigo de infecção humana, impuseram o programa de controle e erradicação da doença. No Brasil, a perda econômica com a brucelose bovina foi estimada, em 1971, como algo em torno de 32 milhões de dólares anuais (Poesteret al., 2002). É muito provável que esses prejuízos estejam subestimados e urge que façamos um levantamento da prevalência da brucelose em todos os estados do Brasil. Assim poderíamos inferir nos prejuízos diretos e indiretos da brucelose nos bovinos e em outros animais de produção (GOMES, 2013).

O PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE foi instituído através da Instrução Normativa nº 2 de 10 de janeiro de 2001, publicada no D.O.U. de 11 de Janeiro de 2001 pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, com os objetivos de baixar a prevalência e a incidência de novos casos de brucelose e de tuberculose, criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

Tendo como propostas técnicas a vacinação contra a brucelose, a certificação de propriedades livres de brucelose e tuberculose, a certificação de propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose, o controle do trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais, o credenciamento e capacitação de médicos veterinários, o diagnóstico e apoio laboratorial, a participação do serviço oficial e a educação sanitária (ALMEIDA, 2008).

Apoia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas (NASCIMENTO et al., 2005), diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. As medidas complementares, são de grande importância, pois visam diminuir a dose de desafio, caso haja exposição, aumentando os índices de proteção da vacina.

A vacina contra a brucelose amostra 19 tem sido usada ao longo de várias décadas como o imunógeno preferencial na prevenção da brucelose dos bovinos (POESTER, 1998).

Mas esta vacina causa a grande maioria dos falsos positivos quando vacina fêmeas com idade igual ou superior a 8 meses, nos testes de soroprecipitação. Esta reação advém do fato de que a amostra 19 de *Brucella abortus* apresenta morfologia colonial lisa, que é incapaz de alterar sua virulência por passagens sucessivas em animais (KOLODA, 2005).

A vacina RB51 foi desenvolvida a partir da amostra 2308 virulenta, uma mutante rugosa que tem a característica de não induzir no animal vacinado a formação da cadeia O – polissacarídeo específico, que interfere nos testes sorológicos, e poderá ser utilizada em programas governamentais (KOLODA, 2005).

O uso da vacina RB51 no Brasil está liberada para uso em casos especiais como os surtos em uma área determinada ou outros casos determinados pelo Serviço Oficial, mas ainda não há produção nacional. A vacina oficial estabelecida para programa de controle empreendido pelo governo brasileiro e utilizada para diminuir a prevalência da doença no país é a B19 (KOLODA, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar estudo soroepidemiológico da *Brucellaabortus* em rebanho bovino na região Sudoeste do Estado do Maranhão.

3.2 Específicos

- Determinar a frequência sorológica no rebanho bovino em diferentes unidades produtoras nos municípios que abrangem a região sudoeste maranhense;
- Realizar as técnicas do Antígeno Acidificado Tamponado, Mercaptoetanol, Elisa Indireto e2 e Teste de Polarização de Fluorescência (FPA) para confirmação da *Brucellaabortus* nos animais soropositivos;
- Identificar fatores de risco associados à doença no rebanho bovino de leite e corte dos municípios que abrange a região sudoeste maranhense;
- Verificar características sanitárias e de produção da pecuária leiteira na região, assim como o nível de conhecimento dos produtores sobre a enfermidade investigada;
- Comparar os resultados obtidos com os de outras regiões do Estado do Maranhão;
- Compartilhar os resultados com a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão e demais órgãos competentes, permitindo a adoção e/ou intensificação de medidas de controle que possam contribuir para a diminuição do impacto socioeconômico da doença nas unidades produtoras de bovino na Região Sudoeste do Estado do Maranhão.

RESULTADOS

CAPÍTULO

ARTIGO

BRUCELOSE: *EPIDEMIOLOGIA* E FATORES DE RISCO DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE MARANHENSE

REVISTA: Revista Brasileira de Medicina Veterinária

ISSN: 0100-2430

QualisCappes: B1

BRUCELOSE: EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE MARANHENSE¹

Reylan Delano Rocha Alencar²; Ronilso de Sousa da Silva³; Rayanne Barros Moreira³; Mateus Queiroz Fontes⁴; Larissa Pimentel de Sá⁴; Priscila Alencar Beserra⁴; Geovania Maria da Silva Braga⁵; Hamilton Pereira Santos⁶ e Ferdinan Almeida Melo⁶

ABSTRACT. Alencar R.D.R., Silva R. de S. da, Moreira R.B., Fontes Q.M., Sá L.P. de, Beserra P.A., Braga G.M. da S., Santos H.P. & Melo F.A. **[Epidemiology and *Brucella abortus* risk factors: the herd beef Southwest Maranhense.]** Epidemiologia e fatores de risco da *Brucella abortus*: no rebanho bovino do Sudoeste Maranhense. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI – Caixa Postal 09 – São Luís, MA, Brasil. E-mail: delano_mv@hotmail.com

Brucellosis is an infectious disease caused by bacteria of the genus *Brucella*. Produces characteristic infection in animals may infect humans. Being a universal distribution zoonosis. Has serious health problems and significant economic losses. In humans, the clinical manifestation is responsible for partial or total incapacity for work. On the information presented, obtaining and publishing the specific results of the Southwest Maranhão region through seroepidemiological study in the detection of *Brucella abortus* in the herd of cattle is very important as part of PNCEBT in the search for evidence a fact of qualifiable and quantifiable manner, in addition to seeking information that might contribute to the adoption and / or intensification of control measures. The study was conducted in 30 properties located in rural areas of the municipalities of Imperatriz, Davinópolis, ribamarfiquene, Freeport, Buritirana and Governor Edson Lobão that are part of the State of Maranhão Southwest. Amarante samples were collected from, Porto Franco and São João do Paraíso also due to closeness and large flow of animals in transit. They collected 550 bovine sera in 30 properties in the study area from September 2014 to July 2015. Thus, we obtained a result of 51 positive samples in the screening test antigen acidified Buffered (AAT), 37 positive samples for confirmatory testing of 2-Mercaptoethanol, 47 positive samples Indirect ELISA, and 34 positive samples for testing Fluorescence Polarization.

Keywords: Brucellosis; Cows; Public health; Zoonoses.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Médico Veterinário. Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI – Caixa Postal 09 – São Luís, MA, Brasil. Autor para correspondência, e-mail: delano_mv@hotmail.com

³ Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGES/MA). Av. Marechal Castelo Branco, nº 13, São Francisco, São Luís/MA, CEP: 65090-160. E-mail: annebmf@hotmail.com / jhonso22@hotmail.com

⁴ Graduando (a), Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, MA, Brasil. E-mail: mateussfontes@hotmail.com / larissapimentel_sa@hotmail.com / priscilalencar15@hotmail.com

⁵Médica Veterinária, DSc, Departamento de Ciências Agrárias, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, R. Godofredo Viana, Imperatriz - MA, 65900-100, Imperatriz, Ma, Brasil. E-mail: geovaniab@yahoo.com.br.

⁶Médico Veterinário, DSc, Departamento de Patologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI – Caixa Postal 09 – São Luís, MA, Brasil. E-mail: hpsluiza@yahoo.com.br / ferdinanmelo@yahoo.com.br.

RESUMO. A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho. Diante das informações apresentadas, a obtenção e publicação dos resultados específicos da região Sudoeste Maranhense, através do estudo soroepidemiológico na detecção da *Brucella abortus* no rebanho bovino assume grande importância, como parte do PNCEBT, na busca de evidenciar uma realidade de forma qualificável e quantificável, além de buscar informações que possam contribuir para a adoção e/ou intensificação de medidas de controle e na redução de prejuízos socioeconômicos causados pela doença na referida região, pois não existe investigação que comprove a existência desta enfermidade. O estudo foi realizado em 30 propriedades localizadas na zona rural dos municípios de Imperatriz, Davinópolis, Ribamar Fiquene, Porto Franco, Buritirana e Governador Edson Lobão que fazem parte do Sudoeste do Estado do Maranhão. Foram coletadas amostras de Amarante, Porto Franco e São João do Paraíso também devido a proximidade e grande fluxo de animais em trânsito. Foram coletados 550 soros bovinos distribuídos em 30 propriedades na área de estudo no período de setembro de 2014 a julho de 2015. Assim, obteve-se um resultado de 51 amostras positivas no teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), 37 amostras positivas para o teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol e 47 amostras positivas no ELISA Indireto, e 34 amostras positivas no Teste de Polarização Fluorescente.

Palavras-chave: Brucelose; Fêmeas bovinas; Saúde pública; Zoonoses.

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. Produz infecção característica nos animais, podendo infectar o homem. Sendo uma zoonose de distribuição universal, acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2006).

Deve notar-se que *Brucella* têm preferências de acolhimento definidas, por exemplo, *B. melitensis* infecta principalmente ovelhas, mas *B. abortus* o hospedeiro principal é o gado e, portanto, a epidemiologia do agente pode ajudar a controlar infecção em ovinos e bovinos, bem como a humana (SALEHI et al., 2006).

Nos bovinos e bubalinos, acomete, de modo especial, o trato reprodutivo, gerando perdas diretas devido, principalmente a abortos, baixos índices reprodutivos, aumento do intervalo entre partos, diminuição da produção de leite, morte de bezerros e interrupção de linhagens genéticas. No Brasil, estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Em 1975, foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5% e Norte, 4,1% (BRASIL, 2004).

A principal via de infecção de *B. abortus* no bovino é a oral, sendo também muito importante a via aerógena. Uma grande quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o aborto e o parto de animais infectados. Estes animais continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias. Esta enorme quantidade de bactérias eliminadas durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à grande resistência de *B. abortus* no ambiente, é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis. Hábitos dos bovinos como lambem e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas, favorecem a transmissão da brucelose (IDAF, 2011).

Não existe nenhum tratamento que apresente uma garantia de eficiência. O controle da brucelose é baseado na higiene, aplicação de vacinas e eliminação dos animais reagentes. Todos estes três controles são muito importantes e o descuido em qualquer um deles poderá tornar o trabalho de erradicação muito difícil (EMBRAPA, 2000).

O estado do Maranhão possui um rebanho bovino total de 7.403.542 (BRASIL, 2012), na qual a prevalência aparente de focos de brucelose está estimada em torno de 11,42% e a prevalência aparente da doença em fêmeas bovinas com idade superior ou igual a 24 meses está estimada em aproximadamente 2,52% (BORBA, 2012).

A Região do Sudoeste Maranhense foi criada por uma Lei Complementar Estadual nº 89 de 2005 e é formada pelos municípios de Imperatriz, João Lisboa, Senador La Rocque, Buritirana, Davinópolis, Governador Edison Lobão, Montes Altos e Ribamar Fiquene (EMPLASA, 2005).

De acordo com Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (2014), a população bovina leiteira da região sudoeste está estimada em 155.633 animais.

Diante das informações apresentadas, a obtenção e publicação dos resultados específicos da região Sudoeste Maranhense, através do estudo soroepidemiológico na detecção da *Brucella abortus* no rebanho bovino de carne e leite assume grande importância, como parte do PNCEBT, na busca de evidenciar uma realidade de forma qualificável e quantificável, além de buscar informações que possam contribuir para a adoção e/ou intensificação de medidas de controle e na redução de prejuízos socioeconômicos causados pela doença na referida região, pois não existe investigação que comprove a existência desta enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 30 propriedades localizadas na zona rural dos municípios de Imperatriz, Davinópolis, Ribamar Fiquene, Porto Franco, Buritirana e Governador Edson Lobão que fazem parte do Sudoeste do Estado do Maranhão. Foram coletadas amostras de Amarante, Porto Franco e São João do Paraíso também devido a proximidade e grande fluxo de animais em trânsito. O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da UEMA número 31/2014.

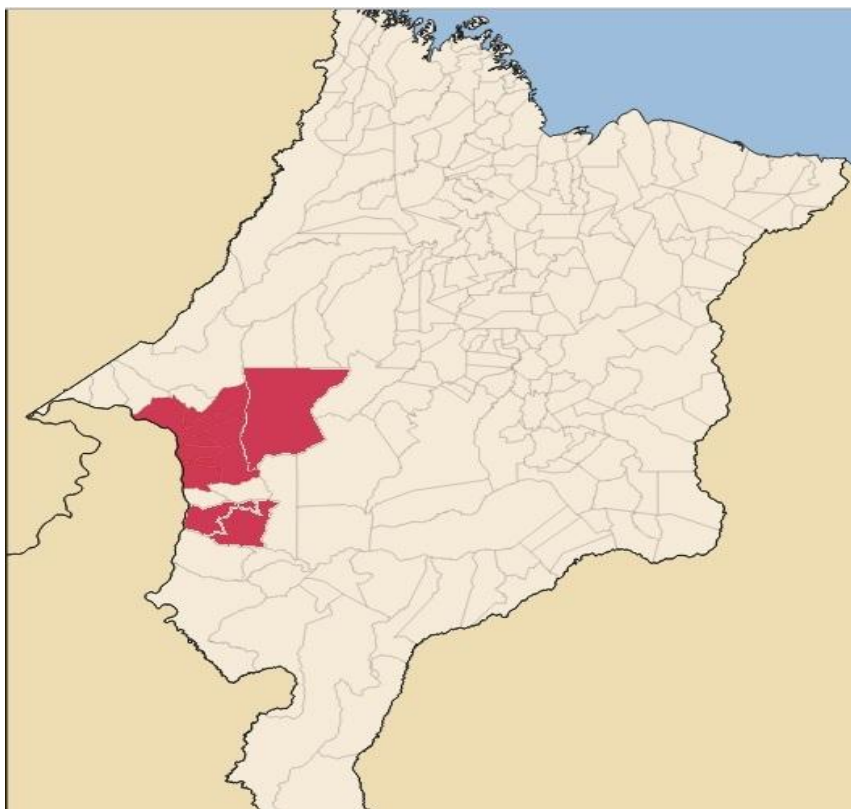


Figura 1. Mapa dos municípios amostrados da região Sudoeste Maranhense.

A região Sudoeste do Estado do Maranhão, que está localizada à margem de uma das mais importantes vias fluviais do Centro Oeste e Meio Norte, o Rio Tocantins, entre as coordenadas geográficas, na latitude de 5°31'33''Sul e na longitude de 47°28'33''Oeste. Altitude de 95 metros, em média, numa área de transição entre o cerrado e a Floresta Amazônica. Território razoavelmente plano e fértil, com uma vegetação bastante explorada, sendo que atualmente apresenta cobertura vegetal, consideravelmente modificada devido a diversas ações antrópicas (MAPSAT, 2012).

Grande parte dessa vegetação, principalmente ao que se refere às periferias dos municípios, encontra-se assolado, e aliado a este fato, está à inexistência de um plano de urbanização (SEMA, 2012).

O clima na região é equatorial quente úmido, por estar situado numa área de transição da Amazônia Legal, com características de altos índices pluviométricos, com média de 1500 a 2500 mm anuais e temperaturas muito elevadas, com médias entre 25°C a 27°C praticamente o ano inteiro. A transposição de cerrado apresenta um clima tropical com características semelhantes da Região Amazônica, com duas estações bem definidas, verão ou estação de seca, nos meses de maio a setembro e inverno ou estação das chuvas, nos meses de

outubro a abril. Segundo o último censo realizado, a área total da região Sudoeste é de 27.157,30 km² e é formada pelos municípios de Imperatriz, João Lisboa, Senador La Rocque, Buritirana, Davinópolis, Governador Edison Lobão, Montes Altos e Ribamar Fiquene (EMPLASA, 2010). Segundo a AGED (2014), a população bovina leiteira está estimada em 155.633 animais (AGED, 2014).

O tamanho da amostra foi determinado através da fórmula do Centro Pan-Americano de Zoonoses (1979), para o estudo de enfermidades infecciosas crônicas, com nível de confiança de 99% e erro amostral de 5%. Como a prevalência estimada não é conhecida utilizou-se no cálculo a prevalência esperada de 50% com o objetivo de maximizar o tamanho da amostra, totalizando 550 amostras coletadas. No entanto, em cada propriedade visitada, foram colhidas amostras a mais como forma preventiva a ocorrência de hemólise. No período de setembro de 2014 a julho de 2015 foram colhidas 550 amostras de soro bovino, provenientes de 30 propriedades da área de estudo, selecionadas por amostragem estratificada de tamanho proporcional ao efetivo bovino existente em cada município por favorecer uma amostra mais representativa da população. Durante as coletas, em cada propriedade foi aplicado um questionário contendo perguntas objetivas referentes ao sistema de produção, manejo sanitário e reprodutivo.

A coleta foi realizada a campo em unidades produtoras de carne e leite no rebanho bovino na referida região, na qual as amostras de sangue colhidas foram de fêmeas bovinas, com idade igual ou superior a 24 meses. Os animais foram avaliados de acordo com a arcada dentária, na determinação da idade aproximada, quando não havia registro sobre a data exata de nascimento do animal.

As amostras foram coletadas por punção da veia jugular, utilizando-se sistema à vácuo estéril sem anticoagulante (Vacutainer) de 10 ml e armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo. As amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro e após a centrifugação o soro foi transferido para tubos tipo eppendorff e em seguida congeladas, para depois realizar os exames sorológicos.

O desenvolvimento das atividades de centrifugação foi executado no laboratório do CESI/UEMA (LABIO), no município de Imperatriz/Maranhão. Já os exames sorológicos de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas no campus da UEMA em São Luís. Os testes de ELISA Indireto e Teste de Polarização de Fluorescência foram realizados em outro laboratório de instituição pública.

Tabela 1. Cidades visitadas correspondentes a Região Sudoeste do Maranhão, bem como, o número de amostras/propriedades, Maranhão 2015.

Cidades	Propriedades Amostradas	Nº de Animais Testados
Imperatriz	2	40
João Lisboa	3	48
Amarante	3	45
Buritirana	3	55
Davinópolis	1	20
Governador Edson Lobão	3	55
Ribamar Fiquene	3	55
São João do Paraíso	5	95
Porto Franco	3	60
Montes Altos	2	40
Senador La Roque	2	35
Total	30	550

Para uma maior homogeneidade da população de bovino dos diferentes municípios, foi utilizada para cálculo do número de propriedades por município, a amostra estratificada de tamanho proporcional ao efetivo bovino existente em cada município por favorecer uma amostra mais representativa da população. Durante as coletas, foram aplicados questionários contendo perguntas objetivas referentes ao sistema de produção, manejo sanitário e reprodutivo em todas as propriedades que participarem do estudo.

As amostras de soro coletadas foram submetidas ao de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), seguido do teste confirmatório 2- mercaptoetanol (2-ME) e teste de Polarização Fluorescente dos animais reagentes. Foram submetidas ao teste de Elisa Indireto também.

O protocolo dos exames e interpretação dos resultados do AAT e 2-ME seguiu a Instrução Normativa nº 41 de 24 de novembro de 2006 (BRASIL, 2006), no qual, foi considerado soropositivo o animal que apresentasse reação positiva ou inconclusiva no teste do 2-ME (caso o animal tivesse uma idade superior a 2 anos) e, como foco, a propriedade cujo rebanho apresentasse pelo menos um animal soro-reagente no teste do AAT.

Os animais positivos deverão ser separados e afastados dos animais de produção, marcados a ferro candente com a marca “P” dentro de um círculo no lado direito da face, e como próximo passo, serem encaminhados para abate sanitário em estabelecimentos com Inspeção Veterinária, num prazo máximo de 30 dias, acompanhados da GTA e informação da condição de positivo em atendimento à legislação vigente.

De forma simultânea à coleta de sangue, foi aplicado um questionário epidemiológico em todas as propriedades para avaliar os fatores de risco de disseminação da

doença. Dentre as principais variáveis analisadas no questionário epidemiológico estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1. Variáveis qualitativas analisadas.

Principais perguntas
Tipo de exploração
Tipo de ordenha
Utiliza leite e derivados para alimentar outros animais
Possui caprinos na propriedade
Possui suínos na propriedade
Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 anos
O que faz com o feto abortado/resto de placenta
Faz teste para diagnóstico de brucelose
Compra fêmeas e machos para reprodução
Vende fêmeas e machos para reprodução
Vacina contra brucelose
Aluga pastos em alguma época do ano
Tem pastos em comum com outras propriedades
Existem na propriedade áreas alagadiças
Possui piquete maternidade
Tem assistência técnica veterinária
Manipula fêmeas com dificuldades de parir

Estimou-se a prevalência de focos (rebanhos com pelo menos um animal soropositivo para brucelose) e a prevalência de animais soropositivos.

Para a identificação dos fatores de riscos associados com a ocorrência da brucelose foi utilizado o teste de qui-quadrado através do programa GraphPadInStat 3. Foi realizada a análise univariada de cada variável independente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme o quadro 2, foram coletados 550 soros bovinos distribuídos em 30 propriedades na área de estudo no período de setembro de 2014 a julho de 2015.

Quadro 2. Distribuição das Unidades Regionais com seus respectivos municípios, bem como, o número de amostras/propriedades, Maranhão, 2015

Unidaderegional	Municípios	Propriedadesamostradas	Nº de animaistestados
Imperatriz	Imperatriz	2	40
	JoãoLisboa	3	48
	Senador La Roque	2	35
	Amarante	3	45
	Buritirana	3	55
	Davinópolis	1	20
	Governador Edison Lobão	3	57
	Ribamar Fiquene	3	55
	São João do Paraíso	5	95
	Porto Franco	3	60
	Montes Altos	2	40
Total		30	550

Assim, obteve-se um resultado de 51 (9,27%) amostras positivas no teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 47 amostras positivas no ELISA Indireto. Desse modo, observou-se uma soro prevalência de 9,27% (51/550) no teste de AAT e 8,54% (47/550) para o ELISA Indireto (tabela 2).

Tabela 2. Frequência de bovinos reagentes para *Brucellaabortus* nos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e ELISA Indireto, por município do Sudoeste Maranhense.

Cidades	Nº Animais	AAT	%	I- ELISA	%
Imperatriz	40	07	17,5	07	15
João Lisboa	48	07	14,6	03	6,25
Senador La Roque	35	01	2,9	01	2,9
Buritirana	55	04	7,3	04	1,8
Amarante	45	04	8,9	04	6,66
Davinópolis	20	00	0	00	00
Governador Edison Lobão	57	09	15,8	09	5,26
Ribamar Fiquene	55	10	18,2	10	7,27
Montes Altos	40	06	15	06	15

Porto Franco	60	00	0	00	00
São João do Paraíso	95	03	3,2	03	3,2
Total	550	51	9,27	47	8,54

Dos 11 municípios amostrados, apenas Davinópolis e Porto Franco não tiveram nenhum animal soropositivo em nenhum dos seus rebanhos. Quanto aos testes de AAT e o ELISA-I, houve mudanças nos resultados apenas no município de João Lisboa, no qual o teste de AAT apresentou uma sensibilidade maior, 14,6% (07/48) e 6,25% (03/48) respectivamente. Nos demais municípios todos apresentaram o mesmo percentual para os dois testes. Isso se deve ao fato de ambos os dois testes possuírem alta sensibilidade.

Essa prevalência encontrada no teste de AAT, está acima do resultado encontrado na microrregião Oeste do Estado do Maranhão no qual 7,12% dos animais foram soropositivos no teste de triagem (SANTOS et al. 2007); o mesmo ocorreu no município de Alegre, no estado do Espírito Santo, cuja 3,5% dos animais foram soropositivos (VIANA, MORAES & ZANINI, 2009), também está bem acima do encontrado por Gonçalves et al. (2009), cuja prevalência encontrada foi de 0,16%; e em relação a microrregião do Centro Maranhense também foi maior, uma vez que 2,73% dos animais foram positivos (SANTOS et al. 2007). Esse resultado está acima da prevalência média nacional, que oscila de 4,0 e 5,0% (BRASIL, 2006).

Como pode ser observado na tabela 3, para o teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol, foi encontrado uma soroprevalência de 6,72% (37/550). A quantidade de animal positivo é menor devido ao teste ter mais especificidade e assim, eliminar as reações falso-positivas que são decorrentes de fatores como a reação devido à presença de anticorpos não específicos presentes nas infecções por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp e que também pode decorrer como resultado da vacinação com B19 caso a vacinação seja realizada na fêmea com idade igual ou superior a 8 meses, e também pode acontecer um falso positivo caso seja realizado o teste de triagem em um período muito curto após a vacinação (BRASIL, 2006).

Tabela 3. Frequência de bovinos reagentes para *Brucella abortus* nos testes Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), por município do Sudoeste Maranhense.

Cidades	Nº Animais	AAT	%	2 –Mercapto	%
Imperatriz	40	07	17,5	06	15
João Lisboa	48	07	14,6	03	6,25
Senador La Roque	35	01	2,9	01	2,9
Buritirana	55	04	7,3	01	1,8
Amarante	45	04	8,9	03	6,66
Davinópolis	20	00	0	00	00
Governador Edison Lobão	57	09	15,8	03	5,26
Ribamar Fiquene	55	10	18,2	04	7,27
Montes Altos	40	06	15	06	15
Porto Franco	60	00	0	00	00
São João do Paraíso	95	03	3,2	03	3,2
Total	550	51	9,27	37	6,72

O último diagnóstico de situação da brucelose bovina em nível Estadual foi realizado em 2012, com obtenção do resultado da porcentagem estimada de animais soropositivos em 2,52%. Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que a prevalência da brucelose dentro do rebanho bovino e o alto número de propriedades com pelo menos um animal positivo indica que o microrganismo está disseminado na região. Ao realizar análise em outros dados de pesquisas nacionais, a prevalência de brucelose entre o rebanho na região Sudoeste do Estado do Maranhão, apresenta-se ligeiramente acima ao encontrado por Monteiro et al. (2006) num estrato do Mato Grosso do Sul onde 6,6% rebanho era soropositivo e inferior ao encontrado por Negreiros (2006) que encontrou no Mato Grosso uma prevalência de 10,25% no rebanho (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006). A prevalência estimada desta enfermidade no rebanho da região Sudoeste Maranhense foi superior também ao encontrado nos Estados do Tocantins (5,27%) e Rondônia (6,22%).

No Estado do Maranhão, Lopes (2003) relatou uma prevalência de brucelose em bovinos com bursite cervical em estabelecimentos de matadouros de São Luís - MA de 5,83%; Silva (2000), ao efetuar um estudo sobre brucelose bovina, no período de 1997 a 1998, no município de Riachão - MA, relatou a ocorrência de 12 (8,45%) animais positivos

para brucelose e Akashi (1998), ao realizar estudo da prevalência de brucelose animal e humana em 02 matadouros do município de Imperatriz - MA, coletou e realizou exames em 660 soros bovinos os quais apresentaram os resultados de 36 (9,39%) e 9 (3,24%) animais com reação positiva nos matadouros que fizeram parte do estudo.

Tabela 4. Frequência de bovinos reagentes para *Brucellaabortus* nos testes de 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Teste de Polarização de Fluorescência, por município do Sudoeste Maranhense.

Cidades	Nº Animais	2 – Mercapto	%	TPF	%
Imperatriz	40	06	15	06	15
João Lisboa	48	03	6,25	03	6,25
Senador La Roque	35	01	2,9	01	2,9
Buritirana	55	01	1,8	01	1,8
Amarante	45	03	6,66	03	6,66
Davinópolis	20	00	00	00	00
Governador Edison Lobão	57	03	5,26	03	5,26
Ribamar Fiquene	55	04	7,27	03	7,27
Montes Altos	40	06	15	04	15
Porto Franco	60	00	00	00	00
São João do Paraíso	95	03	3,2	03	3,2
Total	550	37	6,72	34	6,18

Conforme a tabela 4, é possível observar que tanto o 2-Mercaptoetanol como o Teste de Polarização de Fluorescência tiveram resultados de prevalência aparente aproximados, o que ressalta a alta especificidade dos dois testes, o que no caso foi de 97% para o 2-ME e 96% para o TPF. Tal especificidade aproximada encontrada corrobora com os resultados de Carvalho (2014), onde obteve a prevalência de 3,23% para o 2-ME e 2,47% para o TPF.

Quanto à frequência estimada de focos de brucelose (tabela 5), em propriedades rurais com pelo menos um animal soropositivo, ao analisarmos o número de focos encontrados nos municípios da área de estudo, vimos que das 18 propriedades criadoras de bovinos que foram visitadas, 60% (18/30) apresentaram animais soro positivos, o que demonstra que a Brucelose é uma doença ainda prevalente. As propriedades rurais dos municípios de Imperatriz, Governador Edison Lobão e Montes Altos apresentaram 100% de foco tanto no teste de triagem do AAT como no teste confirmatório 2-Mercaptoetanol. As

propriedades rurais dos municípios de Buritirana, Amarante e São João do Paraíso também apresentam alta frequência de foco.

Tabela 5. Frequência de foco da *Brucella abortus* no teste Antígeno Acidificado Tamponado e 2-Mercaptoetanol, por município da região Sudoeste Maranhense, 2015. (CONTINUA)

FOCO					
Município	Rebanho	AAT	%	2-ME	%
Imperatriz	2	2	100	2	100
João Lisboa	3	3	100	1	33,33
Senador La Roque	2	1	50	1	50
Buritirana	3	2	66,66	2	66,66
Amarante	3	2	66,66	2	66,66
Davinópolis	1	0	0	0	0
Governador Edison Lobão	3	3	100	3	100
Ribamar Fiquene	3	3	100	2	66,66
Montes Altos	2	2	100	2	100
Porto Franco	3	0	0	0	0
São João do Paraíso	5	3	60	3	60
Total	30	21	63,33	18	60

(CONTINUAÇÃO)

Ao comparar o resultado encontrado na região Sudoeste Maranhense com os resultados encontrados na literatura, notamos valores superiores aos relatos nos estados de São Paulo (9,70%; IC 95% 7,80 - 11,60) por Dias (2004), Espírito Santo (9,00%; IC 95% 6,73 - 11,27) (AZEVEDO, 2006), Rio Grande do Sul (2,00%; IC 95% 1,44 - 2,56), Paraná (4,015%; IC 95% 3,23 - 4,80), Minas Gerais (6,04%; IC 95% 4,98 - 7,10), Rio de Janeiro (15,48%; IC 95% 12,99 - 17,97), Bahia (4,30%; IC 95% 3,19 - 5,41), Sergipe (11,24%; IC 95% 7,97 -

14,52), Goiás (16,20%; IC 95% 13,79 - 18,61), Tocantins (20,99%; IC 95% 19,12 - 22,86) (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

Um ponto a ser destacado é que das 21 propriedades que apresentaram foco de brucelose, 10 afirmaram que não possuíam assistência veterinária, assistência a qual se torna vital para reforçar e aprimorar a prática da vacinação de bezerras de 3 meses a 8 meses e de outras medidas sanitárias de acordo com o que preconiza o PNCEBT.

Dutra (2015), ressalta que a ausência do médico veterinário torna-se um obstáculo para o controle de problemas sanitários no rebanho bovino maranhense e cita também a importância da ação em conjunto com realização de ações educativas com a finalidade de esclarecer a importância de realização a vacinação.

A frequência de focos de brucelose bovina encontrada na região Sudoeste do Maranhão é superior também ao observado nos Estados do Mato Grosso do Sul (37,3%) (MONTEIRO et al., 2006), Mato Grosso (41,19%; IC 95% 38,00 - 44,39) (NEGREIROS, 2006) e Rondônia (34,57%; IC 95% 31,49 - 37,65) (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2006).

Quanto aos fatores de risco associados a ocorrência da brucelose bovina nos rebanhos criadores de bovinos na região Sudoeste do Estado do Maranhão, foram avaliadas características relevantes como sistema de produção, manejo sanitário, exames para diagnóstico de brucelose, manejo reprodutivo e acompanhamento veterinário.

Tabela 6. Análise univariada dos possíveis fatores de risco associado a brucelose em municípios da região Sudoeste Maranhense. (Continua)

Variáveis		Brucelose bovina								
		Soropositivos		Soronegativos		Total		OR	IC 95%	P
		N	%	N	%	N	%			
Tipo de exploração	Corte	22	4,00	171	51,00	193	35,00	1.455	0.8112;2.610	0,2670
	Leite	29	5,00	328	60,00	357	65,00			
Tipo de ordenha	Manual	46	8,00	424	77,00	470	85,00	1.627	0.6261;4.230	0,4238
	Mecânica	5	1,00	75	14,00	80	15,00			
Utiliza leite e derivados para alimentar outros animais	Sim	35	6,00	88	16,00	123	22,00	4.320	2.569;7.264	0,0001*
	Não	36	7,00	391	71,00	427	78,00			
Possui caprinos na propriedade	Sim	12	2,00	170	31,00	182	33,00	0.5955	0.3038;1.167	0,1715
	Não	39	7,00	329	60,00	368	67,00			
Possui suínos na propriedade	Sim	31	6,00	352	64,00	383	70,00	0.6473	0.3573;1.173	0,1993
	Não	20	4,00	147	27,00	167	30,00			

Alguma vaca abortou nos últimos 12 meses	Sim	17	3,00	197	36,00	214	39,00	0.7665	0.4167;1.410	0,4798
	Não	34	6,00	302	55,00	336	61,00			
O que faz com o feto abortado e o resto de placenta	Enterra/queima	6	1,00	124	23,00	130	24,00	0.4032	0.16179;0.9682	0.0546
	Não faz nada	45	8,00	375	68,00	420	76,00			
Faz testes para diagnóstico de brucelose	Sim	13	2,00	245	45,00	258	47,00	0.3547	0.1844;0.6821	0,0021*
	Não	38	7,00	254	46,00	292	53,00			
Compra fêmeas e machos para reprodução	Sim	30	5,00	258	47,00	288	52,00	1.334	0.7436;2.395	0,4108
	Não	21	4,00	241	44,00	262	48,00			
Vacina contra brucelose	Sim	50	9,00	485	88,00	535	97,00	1.443	0.1858;11.212	0.7242
	Não	1	1,00	14	3,00	15	3,00			
Aluga pastos em alguma época do ano	Sim	4	1,00	87	16,00	91	17,00	0.4030	0.1415;1.148	0.1192
	Não	47	9,00	412	75,00	459	83,00			
Tem pastos em comum com outras propriedades	Sim	14	3,00	179	33,00	193	35,00	0.8958	0.3663;1.328	0,3439
	Não	36	7,00	321	58,00	357				
Existem na propriedade áreas alagadiças	Sim	27	5,00	352	64,00	379	69,00	0.4698	0.2623;0.8414	0.0152*
	Não	24	4,00	147	27,00	171	31,00			
Possui na propriedade piquete maternidade	Sim	31	6,00	324	59,00	355	65,00	0.7524	0.4226;1.340	0.4132
	Não	22	4,00	173	31,00	195	35,00			
Tem assistência veterinária	Sim	25	5,00	345	63,00	370	67,00	0.4292	0.2401;0.7674	0.0058*
	Não	26	5,00	154	91,00	180	33,00			
Manipula fêmeas com dificuldade de parir	Sim	20	4,00	200	36,00	220	40,00	0.9645	0.5346;1.740	0.9045
	Não	31	6,00	299	54,00	330	60,00			

P<0,05 – estatisticamente significativo
p>0,05 – não estatisticamente significativo

(Continuação)

Em relação a tabela 6, dois valores são importantes, o Oddsratio (OR) que é o dado que informa se a variável é realmente considerada um fator de risco, sendo que o resultado

precisa ser acima de 1 (um), visto que, quanto maior for a cima 1 (um), maior será um fator que representará perigo para a propriedade e o outro é o valor de P, que representa se a variável é estatisticamente significativa ou não, uma vez que esse valor precisa ser abaixo de 0,05.

A análise univariada obteve resultados estatisticamente significativos para as variáveis utilização de leite e derivados para alimentar outros animais ($P=0.0001$), se o produtor realiza testes para brucelose ($P= 0.0021$), existem na propriedade áreas alagadiças ($P= 0.0152$) e se a propriedade possui assistência veterinária ($P= 0.0058$).

As variáveis estatisticamente significativas, testes de diagnóstico para brucelose e assistência veterinária, são consideradas como fatores de proteção, já que através da assistência de um médico veterinário na propriedade possibilitará que o respectivo rebanho tenha um profissional capacitado para buscar soluções para que o rebanho corra menos riscos de contaminação, tendo como base todas as medidas profiláticas, o que ajudará o rebanho na manutenção da sanidade. O mesmo é dito em relação ao teste de diagnóstico, pois através dele o produtor ficará informado sobre a sanidade e qualidade do seu rebanho, dado que, por meio desse teste ele saberá se há fêmeas infectadas e se houver ele tomará as medidas necessárias.

Ao levar em consideração o parâmetro para ser considerado como fator de risco, dentre todas as variáveis analisadas, 11 obtiveram número superior a 1 (um) no OR, apesar de apenas 1 ser classificada como estatisticamente significativa, utilização de leite e derivados para alimentar outros animais, elas não deixam de ser importantes, como por exemplo a vacinação contra a brucelose, que é algo que representa uma segurança para o rebanho, cujo objetivo é fornecer imunidade para as fêmeas bovinas e é a principal medida profilática do PNCEBT. A vacinação é obrigatória para todas as bezerras de 3 a 8 meses. Uma única dose da vacina B-19, contra a Brucelose, protege a fêmea por toda a vida.

A variável tipo de exploração, valor de 1.455 em OR, mostrou-se como fator de risco, uma vez que maiores prevalências associadas ao tipo de exploração são resultantes muitas vezes do controle diagnóstico mais frequente em determinada categoria ou de aproximação do efeito de outras características produtivas, como o tipo de criação e tamanho do rebanho. Houve um maior percentual de animais infectados em vacas de leite, o qual pode ser justificado pelo sistema de criação e por ter uma permanência muito superior no plantel em relação ao gado de corte.

Já no que diz respeito ao tipo de ordenha (OR: 1.627), as duas maneiras oferecem riscos, uma vez que ambas requerem cuidados que muitas vezes não são realizados, como higienizar todo o ambiente e a ordenhadeira, no caso de ordenha mecânica, não permitir que

outros animais consumam o leite contaminado e principalmente que o próprio produtor ou vaqueiro não consumam esse leite in natura. Além do quê, uma vaca positiva pode contaminar um bezerro através do leite, e este, irá se tornar uma fonte de infecção através das fezes.

No que se refere ao que se faz com o feto abortado/resto de placenta, foi possível observar que muitas propriedades mantêm práticas perigosas quando este é o assunto. Houve relatos de casos onde o feto abortado/resto de placenta foram deixados em campo aberto e acessível para animais como por exemplo para porcos e cães, nos quais esses animais podem se tornar reservatórios da doença. Uma das maneiras adequadas de eliminar esses materiais sem que ele represente risco para esses animais é a incineração.

Um fator de risco a ser considerado também é a compra de animais. Segundo Lage et al. (2008), essa pratica é um dos principais fatores para a introdução da brucelose em um rebanho livre. Devido a isso, é primordial que o produtor tenha o cuidado para adquirir animais de propriedades livres de brucelose.

CONCLUSÕES

A prevalência aparente obtida foi de 9,27% no teste de triagem (AAT), 6,72% nos testes confirmatórios de 2-ME, 8,54% no teste de ELISA Indireto e 6,18% no teste de TPF. Foi observado também o foco da brucelose em 18(63,33%) das 30 propriedades que fizeram parte do estudo. Os fatores de riscos estatisticamente significativos foram utilização de leite e derivados para alimentar outros animais, realização de exames para diagnosticar a brucelose, a existência de áreas alagadiças e se a propriedade possui assistência veterinária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGED. Relatório de vacinação do banho leiteiro da Regional de Imperatriz. 2014, 1p.

AKASHI, R. S. de B. Brucelose: prevalência bovina e humana nos matadouros do município de Imperatriz - MA. 1998. 42p. Curso de Especialização em Inspeção Sanitária e Industrial dos alimentos de origem animal (Monografia) Universidade Estadual do Maranhão. 1998.

AZEVEDO, S.S. de. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. 2006. 103 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

BORBA, M.R. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado do maranhão. São Paulo: USP, 2012. 82p. **Dissertação** Doutorado.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Departamento de saúde animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Manual Técnico**. Brasília, 2004. 133p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD67FE040A8C07502246C>. Acesso: 12/11/2015

CARVALHO, R. F. B. Brucelose: prevalência, georreferenciamento de focos e fatores de risco em rebanhos leiteiros, e em seres humanos envolvidos na cadeia produtiva do leite na região do médio mearim, Maranhão. Dissertação Mestrado. 88p. 2014

DIAS, R.A. Caracterização Espacial da Brucelose Bovina no Estado de São Paulo. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DUTRA, M. C. Aspectos epidemiológicos da brucelose bovina no estado do Maranhão no período de 2008 a 2014. Dissertação mestrado. 69 p. 2015.

EMBRAPA. Instruções técnicas: Brucelose diagnóstico e controle. Nº 26, p. 1-3, ISSN 0104-9038, 2000. Disponível em < <http://iquiri.cpafac.embrapa.br/pdf/it26.pdf>>. Acesso: 12/11/2015

EMPLASA. Lei Complementar Estadual do Maranhão nº 89, de 17 de novembro de 2005. Disponível em <<http://www.emplasa.sp.gov.br/fnem/arquivos/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Regi%C3%B5es%20Metropolitanas/Maranhao/LC%2089%20RM%20SUDOESTE%20MARANHENSE.pdf>>. Acesso: 12/11/2015

GONÇALVES, V.S.P.; SOUZA, A.C.; VASCONCELLOS, S.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, supl. 1, p.19-26, 2009.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA E FLORESTAL DE ESPIRITO SANTO. Boletim Epidemiológico – Brucelose – Nº2, 10 de Dezembro de 2011. 6 P. DISPONIVEL EM: http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_Brucelose_01.pdf

LOPES, C.P. de M. Pesquisa de bursite cervical em bovinos com brucelose diagnosticada em matadouro sob inspeção municipal – Frigorífico J.B. 2003, 42p. Graduação em Medicina Veterinária (monografia) Universidade Estadual do Maranhão. 2003.

MAPSAT – Tecnologia em Geoprocessamento. Disponível em: <www.mapsat.com.br> Acesso em 12/11/2015.

MONTEIRO, E.; BOROWIAK, D.; MAYER, H. Brucella Lipopolissacarídeos e polissacarídeos. Ann Inst Pasteur Microbiol. 1987; 138: 102-5.

MONTEIRO, L.A.R.C. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v26n4/a06v26n4/a06v26n4.pdf>. Acesso em 10 jul 2007.

NEGREIROS, R.L. Caracterização da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

SANTOS, H.P.; TEIXEIRA, W. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; PEREIRA, H.M.; OLIVEIRA, R.A.; NEGREIROS, R. C.; SOARES FILHO, P.M.; SANTANA, S.S.; CASTRO, R. S. Brucelose Bovina e Humana Diagnosticada em Matadouro Municipal de São Luís - MA, Brasil. *Ciênc. Vet. Tróp.*, Recife-PE, v. 10, n. 2/3, p. 86 - 94 , 2007.

SEMA - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais. Disponível em: <www.sema.ma.gov.br>. 2002. Acesso em 12/11/2015

SILVA, C.M.S. da. Brucelose em Rebanho Bovino no município de Riachão-MA. 2000. 17f. Especialização (Inspeção Sanitária e Industrial dos Alimentos de Origem Animal). Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2000.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Primeiro relatório parcial: Situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil. São Paulo: USP/FMVZ/VPS, 2006. 83p. SIEGMUND, O H., et al. *El Manual Merck De Veterinária*. Rahway (USA): Merck &Co, Inc, 1981

VIANA, K.F.; MORAES, G.C.; ZANINI, M.S. Frequência da anticorposanti- *Brucella abortus* em rebanhos bovinos de aptidão leiteira no Município de Alegrete, Estado do Espírito Santo. *Acta Vet. Brasil.*, v.3, n.1, p.13-15, 2000

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi constatado, recomenda-se que os proprietários intensifiquem as medidas de controle e profilaxia contempladas no PNCEBT, onde a principal refere-se à vacinação das fêmeas bovinas.

Recomenda-se também que sejam desenvolvidas mais ações educativas para que o produtor rural se sensibilize sobre a importância de ter o acompanhamento de um médico veterinário para que aprimorar as práticas sanitárias em sua propriedade.

Nesse contexto de aprendizado, a participação do público acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da UEMA de Imperatriz e São Luís se torna uma peça importante para a inserção dos graduandos quanto a realidade e desafios do setor agrário do Estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

AGED. Relatório de vacinação do banho leiteiro da Regional de Imperatriz. 2014, 1p.

ALMEIDA, M. C. Brucelose bovina: Vacinas e imunidade. 2008. 19p. cursode Especialização Latu sensu em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal – UCB (Monografia), CAMPO GRANDE – MS. 2008.

AKASHI, R. S. de B. Brucelose: prevalência bovina e humana nos matadouros do município de Imperatriz - MA. 1998. 42p. Curso de Especialização em Inspeção Sanitária e Industrial dos alimentos de origem animal (Monografia) Universidade Estadual do Maranhão. 1998.

ARAYA, I. N.; ELZER P, R.; ENRIGHT F. M., o desenvolvimento de Inverno J. temporal da imunidade mediada por células de proteção e imunidade humoral em BALB / CMICE infectados com *Brucella abortus* em J 774 macrófagos. *Infect Immun*. 1989; 143: 3330-7.

AZEVEDO, S.S. de. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. 2006. 103 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

BEVILACQUA, M.R. Brucelose bovina. Campo Grande: Instituto Qualittas, 2008. 28p.

BLOOD, D. C.; RODOSTITS, O. M. Clínica Veterinária. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 570-579

BORBA, M.R. Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado do maranhão. São Paulo: USP, 2012. 82p. **Dissertação** Doutorado.

BRANDÃO, A.P.; OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, N.B.; VIEIRA, L.Q.; AZEVEDO, V., MACEDO, G.C., et al.. Susceptibilidade do hospedeiro à *Brucella abortus* infecção é mais pronunciada em nocaute de IFN-gama do que a IL-12 / beta2-microglobulina ratinhos duplos-deficiente. *Clin. Dev. Immunol*. 2012, 589494.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Departamento de saúde animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). **Manual Técnico**. Brasília, 2004. 133p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD67FE040A8C07502246> C. Acesso: 12/11/2015

BUNDLE D.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; GIDNEY, M.A.J.; MECKLL, R.J.; PERRY M.B.; PETERS, T. Definição de *Brucella*. Epitopos A & M por reagentes de tipagem monoclonais e de oligossacarídeos sintéticos *Infect Immun*. 1989; 57: 2829-39

CARVALHO, R. F. B. Brucelose: prevalência, georreferenciamento de focos e fatores de risco em rebanhos leiteiros, e em seres humanos envolvidos na cadeia produtiva do leite na região do médio mearim, Maranhão. Dissertação Mestrado. 88p. 2014

CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. A activação e função das MAPKs e os seus substratos, as proteína-quinases activadas por MAPK. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 2011.

CARRERO, J.A.; CALDERON, B.; UNANUE, E.R. Os linfócitos são prejudiciais durante a resposta imune inata precoce contra a *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 203, 2006.

CARDEAL J. A. brucelose. In: Farreras-Rozman, Medicina Interna. 13th Edition. Barcelona: livros Mosby-Doyma SA; 1995, p. 2312-7

CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES. Procedimientos para Estudios de Prevalencia por Muestreo. Buenos Aires, 1979. Nota Técnica 18, **Rev.** 1. 35p.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J. M.; GRAYON, M.; PAQUET, J.Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, F.; et al. A classificação de *Brucella* spp. isolada a partir de mamíferos marinhos por ADN-poli morfismo no locus omp2. *Microbios Infect* 2001; 3 (9):. 729-38

CORBEL, M.J.; STUART, F.A.; BREWER, R. A.. Observações de reações cruzada entre os suaves *Brucella* espécies e outros organismos de gerado. *Dev Biol Figue* 1983; 56: 341-8.

CORREA, W. M. & CORREA, C. N. M.. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: Varela, s.d. 823p.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 195-215.

COSTA, M. Brucelose bovina e eqüina. In: CORREA, F. R, SCHAILD, A.L., MENDEZ, M. D. C. *Doença de ruminantes e equinos*. Pelos: Ed. Universitária /UFPeL. 1998. 651p.

DELPINO, M.V.; BARRIONUEVO, P.; MACEDO, G.C.; OLIVEIRA, S.C.; GENARO, S.D.; SCIAN, R.; et al. Osteoclastogênese em resposta à eliciada por macrófagos *Brucella abortus* infecção requer TLR2 / produção de TNF-alfa dependente de MyD88. *J. Leukoc. Biol.* 91, 2012.

DIAS, R.A. Caracterização Espacial da Brucelose Bovina no Estado de São Paulo. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DIAZ, A.E.; ARAGON; V.. MARIN, C.; ALONSO, B.; TONT, ., MORENO E. Análise comparativa da *Brucella* Os sorotipos A & M E *Yersinia enterocolitica* 0: 9 polissacarídeos para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos, ovinos e caprinos. *J Clin Microbiol* . 1993; 31.

DOMINGUES, P. F.; LANGON, H. *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: Publicações biomédicas LTDA, 2001. p. 205.

DRICOT, A.; RUAL, J.F.; LAMESCH, P.; BEETM, N. Geração da Brucella versão melitensisORFeome 1. GenomeResearch. 2004; 4:. 2201-06.

DUTRA, M. C. Aspectos epidemiológicos da brucelose bovina no estado do Maranhão no período de 2008 a 2014. Dissertação mestrado. 69 p. 2015.

EMBRAPA. Instruções técnicas: Brucelose diagnóstico e controle. Nº 26, p. 1-3, ISSN 0104-9038, 2000. Disponível em < <http://iquiri.cpfac.embrapa.br/pdf/it26.pdf>>. Acesso: 12/11/2015

EMPLASA. Lei Complementar Estadual do Maranhão nº 89, de 17 de novembro de 2005. Disponível em <<http://www.emplasa.sp.gov.br/fnem/arquivos/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Regi%C3%B5es%20Metropolitanas/Maranhao/LC%2089%20RM%20SUDOESTE%20MARANHENSE.pdf>>. Acesso: 12/11/2015

FREER, E.; ROJA, S.N; WEINTRAUB, A.;LINDBERG, A.A.; MORENO, E. Heterogeneidade de Brucellalipopolysaccharidesabortus. Res Micrbiol. 1995; 146: 569-78.

GIAMBARTOLOMEI, G.H.; ZWERDLING, A.J.; CASSATARO, B. L.; FOSSATI, C.A.; PHILIPP, M.T. As lipoproteínas, não lipopolissacárido, são os principais mediadores da resposta pró-inflamatória induzida por morta pelo calor Brucellaabortus. J. Immunol. 173, 4635-4642. 2004.

GONÇALVES,V.S.P.;SOUZA,A.C.;VASCONCELLOS,S.A.Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. Arq. Bras. Med.Vet. Zootec., v.61, supl. 1, p.19-26, 2009.

GOMES, M. J. P. Gênero Brucella spp. FAVET-UFRGS. 2013.

HALLING, S.M.; PETERSON, B.D.; BRICKER, B.J.; ZUERNEI, R.L.; QUING, Z., et al.A conclusão da sequência do genoma de Brucellaabortus e comparação de genomas semelhantes de Brucella. melitensis e Brucella. suis. J Bacteriol. 2005; 8:. 2715-26.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA E FLORESTAL DE ESPIRITO SANTO. Boletim Epidemiológico – Brucelose – Nº2, 10 de Dezembro de 2011. 6 P. DISPONIVEL EM: http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_Brucelose_01.pdf

JIMÉNEZ,B.M.P; GROSS A.A.; DORNAND, J. (2005). Regulamento dos ativadorasmitogênicasquinasas por Brucella spp. expressando uma suave e áspero fenótipo: relação com a invasão do patógeno. Infect. Immun. 73, 3178-3183 10,1128 / IAI.73.5.3178-3183.2005.

KO, J.; SPLITTER, G.A. Interação hospedeiro Molecular em brucelose: compreensão e futureapproaches ao desenvolvimento da vacina para ratos e seres humanos atual. ClinMicrobial Rev. 2003; 16:. 65-78.

KOLODA, M. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM BEZERRAS IMUNIZADAS COM A CEPA B19 DE *Brucellaabortus* (Frederick Bang, 1897). 2005. 69p.

Mestrado em Ciências Veterinárias (**Dissertação**) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: Uma atualização. *RevBrasReprodAnim*, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set. 2008

LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GROVEL, J.P. Brucellalipopolissacarídeo atua como um fator de virulência. *CurrOpin Microbiol*. 2005.

LOPEZ, G.; GUZMAN, V.; MANTEROLA, L. Regulamento de Brucella virulência pelo sistema de dois componentes BvrR / BvrS. *Vet Microbiol*. 2002; 90: 329-39.

LOPES, C.P. de M. Pesquisa de bursite cervical em bovinos com brucelose diagnosticada em matadouro sob inspeção municipal – Frigorífico J.B. 2003, 42p. Graduação em Medicina Veterinária (monografia) Universidade Estadual do Maranhão. 2003.

MACEDO, G.C.; MAGNANI, D.M.; CARVALHO, N.B.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R.T.; OLIVEIRA, S.C. O papel central da maturação de células dendríticas dependente de MyD88 e produção de citocina pró-inflamatória para controlar Brucella abortus infecção. *J. Immunol*. 180, 1080-1087. 2008.

MAPSAT – Tecnologia em Geoprocessamento. Disponível em: <www.mapsat.com.br> Acesso em 12/11/2015.

MARIATHASAN, S., WEISS, D.S.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J.; O'ROURKE, K.; ROOSE-GIRMA, M.; LEE, W.P., et al.(2006). Criopirina activa o inflammasome em resposta a toxinas e ATP. *Nature* 440, 228-232 10.1038 / nature04515.

MATOS, S.H.C. Pesquisa de Brucelose em leite “In Natura” Comercializados Informalmente na cidade de São Luís/MA. 2004. 43f. Graduação em Medicina Veterinária (Monografia)- Universidade Estadual do Maranhão. 2004. MICHAUX-CHARACHON S, G BOURG, JUMAS E-BILAK, GUIGUE-TALET P, ALLARDET-SERVENT A, D O'CALLAGHAN, et al. Estrutura do genoma e filogenia do gênero Brucella. *J Bacteriol* 1997; 179 (10):3244-9

MONROE, K.M.; MCWHIRTER, S.M.; VANCE, R.E. Indução de tipo I interferons por bactérias. *Cell.Microbiol*. 12, 2010.

MONTEIRO, E.; BOROWIAK, D.; MAYER, H. Brucella Lipopolissacarídeos e polissacarídeos. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987; 138: 102-5.

MONTEIRO, L.A.R.C. et al. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v26n4/a06v26n4/a06v26n4.pdf>. Acesso em 10 jul 2007.

MOURA, P.B.L. Investigação soro-epidemiológica da brucelose no município de São Domingos do Maranhão. 2008, 20f. Graduação em Medicina Veterinária (monografia) Universidade Estadual do Maranhão. 2008.

NASCIMENTO, C. Brucelose em búfalos: Detecção de anticorpos antiBrucellasp. Em dois municípios do Estado do Maranhão. 2000. 33f. Graduação em Medicina Veterinária (Monografia)-Universidade Estadual do Maranhão. 2000.

NASCIMENTO, M. V.; SILVA, R. D.; ARAUJO JR, P. P.; OLIVEIRA, L. R.; FERREIRA, W.; MOTERINE, L. G. Aspectos epidemiológicos da Brucellaabortus. abortus Revista Científica Eletrônica De Medicina VeterináriaPeriodicidade Semestral – Edição Número 4 – Janeiro De 2005 - Issn 1679-7353

NEGREIROS, R.L. Caracterização da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

OLIVEIRA, F.S.; CARVALHO, N.B.; BRANDAO, A.P.; GOMES, M.T.; DE ALMEIDA, L.A.; OLIVEIRA, S.C. A interleucina-1 associada ao receptor quinase4 é essencial para o controle de host inicial de Brucellaabortus infecção. Infect. Immun. 79, 2011.

PASQUEVICH, K.A.; GARCIA, S. C.; CORIA, L.M.; ESTEIN, S.M.; ZWERDLING, A.; IBANEZ, A.E., et al. (2010).A porção de proteína de Brucellaabortus, proteínas da membrana externa 16 é um novo padrão moleculares associados a patógeno bacteriano que activa células dendriticas in vivo, induz uma resposta imune Th1, e é uma vacina auto-adjuvantes promissora contra a brucelose sistêmica adquirida e por via oral . J. Immunol. 184, 2010.

PATRICIA, G.C.; GILSON, C.C.M.; VASCO, A.; SERGI, C.O.Brucellasp LPS não conocial: Estrutura, interação com o sistema imune do hospedeiro. Fábricas celulares microbianas. 2006; 5: 131-11.

PRAZERES, M.P.C. de S.Soroprevalência da brucelose e identificação dos fatores de risco para o rebanho bovino do município de São Francisco do Brejão - maranhão. São Luís: UEMA, 2012. 82p. **Dissertação** Mestrado.

POESTER, F. P.; RECKZIEGEL, P. E. PERSISTÊNCIA DE REAÇÕES SOROLÓGICAS EM BÚFALAS (*Bubalusbubalis*) VACINADAS COM *Brucellaabortas* AMOSTRA 19. PESQ. AGROP. GAÚCHA, v.4, n.1, p.39-41, 1998.

RAETZ, C.R. Bioquímica de endotoxinas. Ann RevBiochem. 1990; 59:. 129-70[PubMed]

SANTOS, H.P.; TEIXEIRA, W. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; PEREIRA, H.M.; OLIVEIRA, R.A.; NEGREIROS, R. C.; SOARES FILHO, P.M.; SANTANA, S.S.; CASTRO, R. S. Brucelose Bovina e Humana Diagnosticada em Matadouro Municipal de São Luís - MA, Brasil. Ciênc. Vet. Tróp., Recife-PE, v. 10, n. 2/3, p. 86 - 94 , 2007.

SALCEDO, S.P.; MARCHESINI, M.I.; LELOUARD, H.; FUGIER, E.; JOLLY, G.; BALOR, S.;et al. (2008) Brucella controle da maturação de células dendríticas é dependente da proteína contendo TIR Btp1. PLoSPathog. 4: E21 10.1371 / journal.ppat.2008.

SALEHI, M.; PISHVA, E.; SALEHI, R.; RAHMANI, M. Isolation of Brucellaabortus Using PCR-RFLP Analysis. Iranian J Publ Health, Vol. 35, No. 4, 2006, pp.22-27- Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais. Disponível em: <www.sema.ma.gov.br> Acesso em 12/11/2015

SIEGMUND, O H., etall. El Manual Merck De Veterinária. Rahway (USA): Merck & Co, Inc, 1981.

SILVA, C.M.S. da. Brucelose em Rebanho Bovino no município de Riachão-MA.2000. 17f. Especialização (Inspeção Sanitária e Industrial dos Alimentos de Origem Animal). Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2000.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. Primeiro relatório parcial: Situação epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil. São Paulo: USP/FMVZ/VPS, 2006. 83p.SIEGMUND, O H., etall. El Manual Merck De Veterinária. Rahway (USA):Merck &Co, Inc, 1981

VIANA, K.F.; MORAES, G.C.; ZANINI, M.S. Frequência da anticorposanti- Brucellaabortus em rebanhos bovinos de aptidão leiteira no Município de Alegrete, Estado do Espírito Santo. Acta Vet. Brasil.,v.3,n.1,p.13-15,2000.

VIZCAINO, N.; CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; FERNANDEZ-LAGO, L. Caracterização de um Brucella fragmento de ADN de 25 quilobases espécies detectadas a partir de Brucellaabortus revela um grande aglomerado de genes relacionado com a síntese de um polissacarídeo. Infectimunitário. 2001; 69: 6738-48.[PMC artigo livre] [PubMed].

WILFERT, C.M. Brucella. In: ZinsserMicrobiology. Joklik WK, Willet HP, Mestrado AB. 18 Edição. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986, p. 764-71.

9. APÊNDICE

APÊNDICE A

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESCLARECIMENTOS

Através do Programa de Mestrado em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, o projeto intitulado “EPIDEMIOLOGIA DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE MARANHENSE” tem como objetivo determinar a frequência sorológica da brucelose no rebanho bovino em diferentes unidades produtoras nos municípios que abrangem a região sudoeste maranhense, assim como identificar fatores de risco associados à doença. Para tal, há a necessidade de realizar coleta de sangue bovino e também de realizar entrevista através do questionário epidemiológico em cada propriedade amostrada. Parte do material coletado é encaminhado para exames laboratoriais, necessários para a investigação. O restante do material não utilizado é armazenado para novos exames, se necessário. A obtenção da amostra de sangue para esta pesquisa não implicará em riscos adicionais para a saúde do animal. A amostra de material biológico será identificado no laboratório no formato de letras e números, preservando sua identidade e privacidade. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a garantir o anonimato do proprietário. A brucelose bovina e bubalina é de notificação obrigatória, de acordo com art. 5º do Decreto 5.741/2006, que regulamenta o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT e com a IN 30/2006, que disciplina a habilitação de Médicos Veterinários. Não existem benefícios ou diretos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida sobre este documento ou em relação à pesquisa, por gentileza, entre em contato com: Reylan Delano Rocha Alencar, pelo telefone (98) 8212-9022.

CONSENTIMENTO

Pelo presente instrumento, que atende as exigências legais, o(a) senhor(a) _____ sujeito de pesquisa, ciente dos procedimentos aos quais serão realizados, não restando quaisquer dúvidas a respeito do exposto, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO de concordância em participar da pesquisa proposta, autorizando a coleta de sangue bovino na propriedade _____ na cidade de _____, para realização de exames de Brucelose. Fica claro que o sujeito da pesquisa fica ciente e de acordo com as normas do Regulamento Técnico do PNCEBT.

CRIADOR

RG/CPF:

Reylan Delano Rocha Alencar
Médico Veterinário CRMV/MA: 01528 VP
Mestrando em Ciência Animal – 14MCA016

APÊNDICE B

PROJETO: EPIDEMIOLOGIA DA *Brucella abortus* NO REBANHO BOVINO DO SUDOESTE MARANHENSE**QUESTIONÁRIO SOROEPIDEMIOLÓGICO BRUCELOSE BOVINA**

01- Identificação: Município: _____ Proprietário: _____ Propriedade: _____ Cód. De cadastro no serviço de defesa: _____	02 –Data de visita e colheita ____/____/____
	03 –Cód. do rebanho no estado (9díg.) ____/____/____/____/____/____/____/____/____
	04 – Coordenadas Lat __ __ ° __ __' __ __ . __ __ " Lon __ __ ° __ __' __ __ . __ __ " Altitude _____

05 – Tipo de Exploração () Corte () leite () mista
06-Tipo de Criação: () confinado () Semi-confinado () extensivo
07- N° de Ordenhas por dia: () 1 ordenha () 2 ou 3 ordenhas () Não ordenha
08-Tipo de Ordenha: () Manual () mecânica ao pé () mecânica em sala de ordeha
09- Produção de leite: a) N° de vacas em lactação: _____ b) Produção diária de leite na fazenda: _____ litros
10- Utiliza leite e derivados de bovinos para alimentar outros animais da propriedade? () Não () Sim Se sim, o que utiliza? _____ Para que animais? _____
11-Usa inseminação artificial? () Não () Usa inseminação artificial e touro () Usa só I.A.
12- Raça predominante: Bovinos () zebu () Europeu de leite () Mestiço () Outras raças Bulbalinos() Murrah () Mediterrâneo () Carabao () Outras raças

13(a)- Bovinos existentes			12(b)- Bulbalinos existentes		
Machos castrados	Machos inteiros (meses)	Fêmeas (meses)	Machos castrados	Machos interiores (meses)	Fêmeas (meses)

Total	0-6	6-12	12-24	>24	0-6	6-12	12-24	>24	Total	0-6	6-12	12-24	>24	0-6	6-12	12-24	>24

14- Outras espécies na propriedade:(☐) Ovinos/caprinos. Quantos _____ (☐) Equídeos. Quantos _____ (☐) Suínos. Quantos _____ (☐) Aves. Quantos _____ (☐) Cães. Quantos _____ (☐) Gatos. Quantos _____

15- Espécies silvestres em vida livre na propriedade:(☐) Não tem (☐) Cervídeos (☐) Capivaras (☐) Outras _____

16- Alguma vaca/búfala abortou nos últimos 12 meses?(☐) Não (☐) Sim (☐) Não sabe

17- O que faz com o feto abortado e a placenta?(☐) Enterra/joga em fossa/queima (☐) Alimenta porco/cão (☐) Não faz nada

18- Faz testes para diagnóstico de brucelose?(☐) Não (☐) Sim

Regularidade dos testes: (☐) Uma vez ao ano (☐) Duas vezes ao ano (☐) Quando compra animais (☐) Quando há caso de aborto na fazenda (☐) Quando exigido para trânsito/eventos/créditos

19- Compra fêmeas ou machos com finalidade de reprodução?(☐) Não (☐) Sim

20- Vende fêmeas ou machos para reprodução?(☐) Não (☐) Sim

A quem/onde: (☐) Em exposição (☐) Em leilão/feira (☐) A comerciante de gado (☐) Diretamente de outras fazendas

21- Vacina contra brucelose?(☐) Não (☐) Sim, apenas fêmeas até 8 meses de idade (☐) Sim, fêmeas de qualquer idade

22- Local de abate das fêmeas e machos no fim da vida reprodutiva:(☐) Na própria fazenda (☐) Matadouro municipal (☐) Frigorífico (☐) Em estabelecimento sem inspeção veterinária (☐) Não abate

23- Aluga pastos em alguma época do ano?(☐) Não (☐) Sim

24- Tem pastos em comum com outras propriedades?(☐) Não (☐) Sim

25- Existem na propriedade áreas alagadiças às quais o gado tem acesso?(☐) Não (☐) Sim

26- Tem piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós parto?(☐) Não (☐) Sim

27- A quem entrega leite?(☐) Cooperativa (☐) Laticínio (☐) Direto ao consumidor (☐) Não entrega

28- Resfriamento do leite: (☐ Não faz (☐ Faz Como: (☐ Em resfriador ou tanque de expansão próprio (☐ em resfriador ou tanque de expansão coletivo
29- A entrega do leite é feita a granel? (☐ Não (☐ Sim
30- Produz queijo e/ou manteiga na propriedade? (☐ Não (☐ Sim Finalidade: (☐ P/ consumo próprio (☐ P/ venda
31- Consome leite cru? (☐ Não (☐ Sim
32- Tem assistência veterinária? (☐ Não (☐ Sim De que tipo? (☐ Veterinário da cooperativa (☐ Veterinário particular
33- Manipula fêmeas com dificuldade de parir? (☐ Não (☐ Sim

Nome do
veterinário _____ Assinatura _____

APÊNDICE C

REGISTRO DOS ANIMAIS

Propriedade: _____

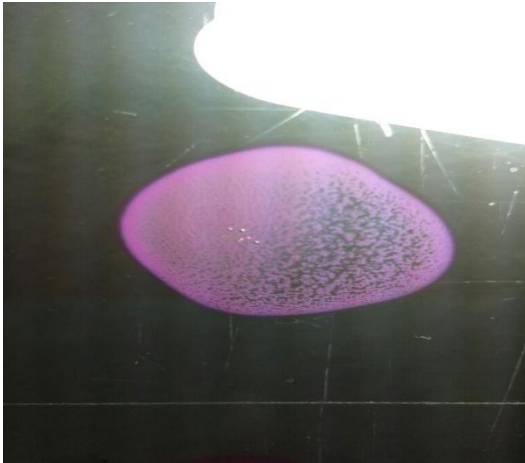
Proprietário: _____

Data: ____/____/____

				JÁ ABORTOU?	VACINAS
Nº DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	RAÇA	IDADE	PELAGEM	Nº DE PARIÇÕES	
				SIM	BRU. LEPT.
				NÃO	IBRBVD

APÊNDICE D





**Amostra positiva no teste do
Antígeno Acidificado Tamponado**



**Amostra positiva no teste do
2-Mercaptoetanol**

ANEXO