

Universidade Federal de Juiz de Fora
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados

Marciel Assis de Oliveira

Diagnóstico sorológico da brucelose bovina no
município de Paraíba do Sul-RJ

Juiz de Fora-MG, 2016.

Marciel Assis de Oliveira

**Diagnóstico sorológico da brucelose bovina no
município de Paraíba do Sul-RJ**

“Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados, da Universidade Federal
de Juiz de Fora, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre.”

Orientador: Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos.

Juiz de Fora-MG, 2016.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Marciel Assis de.

Diagnóstico sorológico da brucelose bovina no município de Paraíba do Sul-RJ / Marciel Assis de Oliveira. -- 2016. 71 p.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2016.

1. Brucelose. 2. Bovinos. 3. PNCEBT. 4. Prevalência. 5. Leite. I. Anjos, Virgílio de Carvalho dos, orient. II. Título.

Diagnóstico sorológico da brucelose bovina no município de Paraíba do Sul-RJ

Marciel Assis de Oliveira

ORIENTADOR (A): Virgílio de Carvalho dos Anjos

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 12/08/2016.

Virgínio Pereira da Silva Júnior

Maria José Valenzuela Bell

Virgílio de Carvalho dos Anjos

Dedico este trabalho a DEUS, a meus pais e toda minha família que acreditaram neste ideal, e principalmente a minha esposa que sempre me entendeu e sempre me doou forças para levar a caminhada até o final, a todos um muito obrigado.

Agradecimentos

Em especial ao professor Virgílio dos Anjos que aceitou a árdua empreitada de orientar mais um aluno e acatar a ideia proposta inicial do projeto de pesquisa. Agradeço pela paciência e tranquilidade, e principalmente na aceitação das colocações feitas durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores: a todos os ensinamentos e bagagem de experiência que nos dá segurança e o crescimento intelectual, em especial a Nívea Vicentini, Paulo Henrique, Lorildo Stock, que além de ensinamentos, conselhos profissionais.

Aos professores membros da banca examinadora que aceitaram a tarefa de contribuir para melhoria deste trabalho.

Aos meus colegas de turma que prosseguiram até o final e para aqueles que ficaram à beira do caminho, que todos continuem sonhando como no início desta caminhada, e que lembrem que nunca é tarde para que se chegue a um novo patamar na vida, e lembrem de que seremos unidos por uma força maior do que tudo, a força de DEUS.

Aos colegas de trabalho da Defesa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, pela colaboração, contribuição e conselhos. Em especial ao Superintendente de Defesa Agropecuária Paulo Henrique e o Coordenador Estadual de Defesa Sanitária Animal Virgínio Júnior.

A minha esposa Djanira, que em uma só palavra se resume a sua importância em minha vida, maravilhosa, sempre comigo em todos os projetos de minha vida, e agora ainda mais importante, por ter me dado à oportunidade de ser pai de um menino tão querido, nosso Pedro Henrique.

Aos meus pais, Vicente e Ivone, pela força de sempre no que foi necessário, não só na caminhada durante a graduação, mas durante todo o ensino fundamental e curso técnico, através dos quais hoje tenho uma profissão e sou muito grato, pois todas as minhas conquistas até o momento veio através desta.

Agradeço a todos os produtores e amigos que colaboraram em ceder seus animais para realização das coletas, obrigado pela confiança e parabéns por fazerem parte do crescimento da pecuária leiteira de nossa região!

E não podia de deixar de agradecer as mais importantes peças ao longo de meu aprendizado, as vacas, que são a razão da existência deste mestrado e do presente trabalho. Obrigado por deixar entrar em suas vidas e fazer parte das nossas nos fornecendo o nosso leite de cada dia!

“Durante muito tempo a juventude esperou as normas do poder para se rebelar de forma bossal e inócua. Nossa alternativa agora é ditar as regras do jogo, e construir um mundo justo onde exista dignidade para todos.”

(Autor desconhecido)

Resumo

O presente trabalho teve o objetivo estimar a prevalência da brucelose em bovinos de leite do município de Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro, levantando-se a presença de casos em propriedades e vacas previamente sorteadas. O número de fêmeas examinadas por propriedade seguiu o seguinte protocolo: nas propriedades com até 99 fêmeas acima de 24 meses foram coletadas 10 amostras de sangue; nas propriedades com número de fêmeas acima de 99 e com idade superior a 24 meses coletou-se 15 amostras de soro sanguíneo. Os resultados utilizando o método do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) revelaram uma prevalência em propriedades e rebanhos de 6,66% e 0,59% respectivamente de infectados. Isto nos possibilita afirmar que houve uma queda acentuada na prevalência da zoonose na região ao compararmos da com estudo anterior que apresentou 14,52% e 2,32% de rebanhos e animais infectados na mesma região em 2003. O número de fêmeas vacinadas com amostras B19 no município possibilitou relacionar o número de casos aos índices vacinais, ficando com uma cobertura vacinal próximo de 70% e de propriedades com vacinação regular em torno de 50%, podendo-se afirmar que o número alto de fêmeas colaborou com a queda da prevalência. Para queda adicional sugerimos a implantação de programas de educação continuada em educação agropecuária no intuito de que se entendam os riscos e importância da manutenção de rebanhos livre da doença, já que fatores de risco foram encontrados no levantamento epidemiológico como introdução de animais sem exames em plantéis e descarte inadequados de fetos abortados e restos placentários. Programas de vacinação em massa de fêmeas entre 3 e 8 meses de idade com amostra B19 devem ser incentivados para que se atinja índices vacinais acima de 80% conforme preconizados pelo PNCEBT. A partir deste ponto segue a etapa de erradicação, evitando que a zoonose se propague e contamine seres humanos, já que no município existe o hábito de consumo pela população de leite in natura e de queijos artesanais feitos de leite cru como ocorre em outras regiões do estado e do país.

Palavras-chave: Brucelose ; Bovinos ; PNCEBT ; Prevalência ; Leite.

Abstract

This study aimed to estimate the prevalence of brucellosis in the city of Paraíba do Sul dairy cattle in the state of Rio de Janeiro, raising the presence of cases in properties and randomly chosen cows. The number of females examined per property followed the protocol: in properties with up to 99 females with 24 months of age were collected 10 blood samples; in properties where the number of females exceeds 99 and 24 months of age were collected 15 samples of blood serum. The results using the method of Antigen buffered plate (AAT) revealed a prevalence of infected in properties and herds of 6.66% and 0.59%, respectively. This enables us to say that there was a sharp drop in the prevalence of the zoonosis in the region when comparing with previous study which showed 14.52% and 2.32% of herds and animals infected in the same region in 2003. The number of females vaccinated with B19 samples in the city makes possible to relate the number of cases to vaccination rates, getting a coverage close to 70% and properties with regular vaccination around 50%, it can be said that the high number of females collaborated with falling prevalence. For further drop we suggest the implementation of continuing education programs in agricultural education in order to understand the risks and importance of maintenance-free disease herds since risk factors were found in epidemiological survey and introduction of animals without testing in breeding stock and inadequate disposal of aborted fetuses and placental remains. Large scale vaccination programs in females between 3 and 8 months of age with B19 must be encouraged to bring to vaccination rates above 80% as recommended by the PNCEBT. From this point follows the stage of eradication, preventing the zoonosis to spread and infect humans, since in the city there is the habit of consumption by the population of fresh milk and artisan cheeses made from raw milk as in other regions of the state and country.

Key-words: Brucellosis; Cattle; PNCEBT; Prevalence; Milk.

Lista de Abreviações

CCQPAI - Coordenadoria de Controle de Qualidade de Produtos Agropecuários Industrializados

CDSA- Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal

MAPA-Ministério da Agricultura e Pecuária

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

RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal

SEAPEC – Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária

SIE - Serviço de Inspeção Estadual

SUASA - Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária

AAT- Antígeno Acidificado Tamponado

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CCPL- Cooperativa Central dos Produtores de Leite

TAL - Teste do Anel em Leite

UHT - Ultra High Temperature

FC - Fixação de Complemento

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

pH – potencial Hidrogeniônico

OIE - Organização Internacional de Epizootias

SAL- Soro Aglutinação Lenta

GTA – Guia de Trânsito Animal

FEPI- Ficha Epidemiológica

Lista de Figuras

Figura 1: Micrografia eletrônica de <i>B. abortus</i> localizado dentro de cisternas de células Vero	21
Figura 2: Mecanismo de transmissão da <i>Brucella ssp.</i>	25
Figura 3: Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos infectados por amostra patogênica <i>Brucella abortus</i> ou vacinados com amostra B19.....	29
Figura 4 : Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos infectados por amostra patogênica <i>Brucella abortus</i>	29
Figura 5 : Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos vacinados com amostra B19 de <i>Brucella abortus</i>	30
Figura 6 : Mapa da prevalência da brucelose no rebanho bovino do Brasil no ano de 2002	33
Figura 7 :Título de anticorpos em bovinos infectados por <i>B. abortus</i>	39
Figura 8:Folder vacinação de fêmeas entre 3 e 8 meses contra brucelose - educação sanitária.....	43
Figura 9 : Mapa da Divisão Político Administrativa do Estado do Rio de Janeiro.....	45
Figura 10 : 10-A: Resultado do teste AAT: Reação positiva; Figura 10:B: Distribuição das amostras sobre a placa para leitura.....	52
Figura 11: Porcentagem de rebanhos vacinados anualmente contra brucelose de 2011 a 2015.....	56
Figura 12 : Porcentagem de fêmeas vacinadas entre 2011 e 2015 contra brucelose com amostra B19 na faixa etária de 3 e 8 meses.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resistência de <i>Brucella sp.</i> em algumas condições ambientais em relação ao tempo.....	32
Tabela 2: Divisão político administrativa do Estado do Rio de Janeiro.....	44
Tabela 3: Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios.....	45
Tabela 4: Casos positivos comunicados na Ficha Epidemiológica (FEPI) mensal em Paraíba do Sul entre 2012 a 2015.....	51
Tabela 5: Prevalência de vacas soro reagentes em 2003.....	52
Tabela 6: Total de fêmeas bovinas por faixa etária em Paraíba do Sul em 2016 participantes da sorologia.....	53
Tabela 7: Total de fêmeas bovinas amostradas por rebanho e positivas ao teste do AAT para brucelose em Paraíba do Sul.....	54
Tabela 8: Prevalência de animais e rebanhos infectados pela brucelose no município de Paraíba do Sul-RJ.....	54
Tabela 9: Fêmeas vacinadas em relação ao número de fêmeas existentes no período de 2011 a 2015.....	55
Tabela 10-Resultados questionário dos possíveis fatores de risco para a brucelose nas propriedades participantes da sorologia.....	60

Índice

1-INTRODUÇÃO.....	15
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1- Brucelose: uma doença endêmica no Brasil.....	19
2.2 - Patogenia da <i>Brucella abortus</i>	22
2.3 - Ciclo Epidemiológico.....	23
2.4- Prevenção e controle - Amostras vacinas B19 e RB51	25
2.5- Sintomas nos seres humanos.....	30
2.6- Sinais clínicos nos animais.....	31
2.7- A resistência do gênero <i>Brucella</i> e o contágio pela brucelose.....	32
2.8- Implantação de programas de controle.....	36
2.9- Métodos de diagnóstico.....	37
2.9.1- Método Antígeno Acidificado Tamponado - AAT.....	40
2.9.2- Teste do Anel em Leite- TAL.....	40
2.9.3- Método 2-Mercaptoetanol- 2-ME.....	41
2.9.4 - Fixação de Complemento – FC.....	41
2.10-A prevenção das doenças e a Educação Sanitária em Defesa Agropecuária.....	41
2.11-Divisão político administrativa do Estado do Rio de Janeiro.....	43
2.12- Municípios do Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios.....	45
2.13 - Habilitação de médicos veterinários atuação PNCEBT.....	45
3-OBJETIVOS.....	47
3.1- Objetivos Gerais.....	47
3.2- Objetivos específicos.....	47
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1-Delineamento amostral do sorodiagnóstico com AAT.....	47
4.2- Índices vacinais B19 e fatores de risco.....	49
4.3-Logística.....	49
5-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1- Resultados Sorologia com AAT.....	50
5.2- Avaliação dos índices vacinais B19.....	54
5.3 - Avaliação dos fatores de risco da brucelose.....	58
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Rio de Janeiro situado na região Sudeste do Brasil, um dos menores estados da Federação ocupando uma área de 43.766,6km²(CIDE, 2006), conta com rebanho bovino efetivo de 2.341.604 cabeças aproximadamente (SEAPEC, 2015). O município de Paraíba do Sul está localizado a 120 km de distância da capital fluminense com 580,525 km² conta com uma população aproximada de 34.908 bovinos em 2015, tendo um efetivo médio de vacas ordenhadas de 7.245 cabeças, com uma produção média diária de 8.863 litros de leite (IBGE, 2015).

Como na maioria dos estados da Federação, a produção de leite no estado do Rio de Janeiro se concentra em pequenas propriedades, ocupando a 13^a posição nacional, com uma produção pouco expressiva em relação aos principais estados produtores, representando apenas 0,4% do produto interno bruto e contribuindo com apenas 5% da produção de leite da região Sudeste, sendo caracterizada por sistemas produtivos com o uso de pouca e baixa tecnologia (IBGE, 2006).

De acordo com o censo agropecuário de 2006, aproximadamente 51% da produção agropecuária é proveniente de estabelecimentos com menos de 100 hectares, e estas áreas englobam todas as atividades rurais e não apenas a pecuária de leite. A pequena área utilizada na maioria dos estabelecimentos rurais indica a inviabilidade de sistemas de produção de leite extensivos (GOMES, 2001).

O aumento da produtividade é a melhor forma para aumentar a renda do produtor, devendo-se intensificar os modelos de produção, obtendo a maior produção por área de pasto, liberando áreas para a preservação de matas e nascentes, tendo o modelo de pecuária sustentável que tanto se almeja atualmente, realizando tecnologias de custos baixos e altos impactos. Em estudo anterior o cenário da produção de leite na região centro-sul fluminense correspondia a 35,22% da produção do estado, e que 41,93% dos produtores produziam até 30 litros de leite por dia e que 2,37% produziam mais de 500 litros por dia, representando 25,53% da produção total (GOMES, 2001).

Visando o crescimento da atividade leiteira e o bem estar dos envolvidos na atividade, as informações sobre riscos de saúde associados ao leite cru

contaminado devem ser estendidas a sociedade, de modo a evitar o consumo do mesmo, com alta contagem microbiana e ocorrência de patógenos que são capazes de afetar a manutenção da qualidade e segurança do leite cru bem como dos produtos dele derivados. A área das ciências veterinárias tem o objetivo de prevenir doenças transmitidas por animais ao homem. Em toda a cadeia da criação dos animais domésticos, sejam os de produção ou estimação, o médico veterinário deve estar envolvido. Especificamente, esta cadeia corresponde ao nascimento, criação, manejo, prevenção, tratamento, cura, abate, processamento industrial e vigilância em saúde, visando o bem estar animal e a sanidade, favorecendo o desenvolvimento e permanência dos seres em constante interação com o meio onde vivem (ROUQUAYROL, 2003).

A higiene na fazenda leiteira e a sanidade de rebanhos influencia diretamente a produção direcionando os resultados econômicos e as perspectivas de segurança sanitária de seres humanos, sendo importante garantir a alta qualidade da produção do leite cru com animais saudáveis e em boas condições de higiene, além de aplicar medidas de controle para proteger a saúde do homem (MUBARACK et al. 2010).

O leite por ser um alimento altamente nutritivo, composto em média por 87,3% de água e, 12,7% de sólidos totais, distribuídos da seguinte forma: 3,3 a 3,5% de proteínas totais, 3,5 a 3,8% de gordura, 4,9% de lactose, 0,7% de minerais, além de vitaminas, é amplamente utilizado na alimentação de neonatos humanos como única fonte proteica diária (SGARBIERI, 2005). É ainda, além de seus derivados, importante fonte de minerais, vitaminas e proteínas de alto valor biológico, com nutrientes capazes de modular funções fisiológicas específicas, o que o torna fonte de ingredientes funcionais estimulador do sistema imunológico. O consumo de leite está associado à prevenção de osteoporose, hipertensão arterial, ao controle do peso corpóreo e até a modulação da gordura corporal, entre outros fatores (AUGUSTINHO, 2015). Por isso, são exigidos padrões de produção com limites para a Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) por meio da Instrução Normativa nº 62 do MAPA, que estabelece um cronograma para a redução gradual destes em função da região, de modo a melhorar a qualidade do leite produzido no país. Além disso, a IN 62 define os

requisitos físicos, químicos e microbiológicos do leite, entre eles, teor de gordura, proteína e extrato seco desengordurado (BRASIL, 2011).

Dentre muitas das patologias que acometem animais domésticos, inclusive bovinos, e representam risco para o homem, tem-se a brucelose, uma patologia infectocontagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella sp.* Trata-se de uma zoonose com distribuição universal, que causa uma infecção crônica caracterizada por abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos. As perdas advindas são consideráveis tais como, a baixa eficiência reprodutiva e consequente diminuição do rebanho. Estima-se que a queda na produção de leite e carne seja da ordem de 25% (LAGE et al. 2008).

A *Brucella sp.* por ser um patógeno com afinidade pela glândula mamária de animais infectados, pode ser eliminada através do leite, representando um risco ao consumidor de derivados do leite cru e do leite propriamente dito, sendo uma das bactérias presentes no leite que além de aumentar a CCS, causa queda na produtividade, alterando a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, o rendimento e qualidade dos derivados lácteos. Na composição ocorre aumento no teor de proteína, porém, com uma redução na fração caseínica, além de redução nos teores de gordura e lactose e um aumento no teor de gordura (ARASHIRO, 2006).

Assim, fazem-se necessários procedimentos de segurança alimentar para garantir um produto seguro para a alimentação humana sem transmissão da zoonose chamada brucelose que, para os seres humanos, pode ser classificada como enfermidade ocupacional para aos que lidam diretamente com animais ou com seus produtos, como fazendeiros, médicos veterinários, magarefes, açougueiros e trabalhadores da indústria de laticínios (POESTER, 2009; MAPA, 2006).

A brucelose bovina é a mais prevalente no Brasil, sendo considerada endêmica segundo os dados oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Levantamento epidemiológico realizado entre os anos de 2001 e 2004 demonstrou que a prevalência de brucelose em 82% do efetivo bovino no Brasil variou entre 0,06% e 10,2%. A infecção leva à ocorrência de endometrites, retenção placentária, abortamentos, redução na vitalidade dos bezerros por morte precoce ou subdesenvolvimento (30%), diminuição da

lactação (20%), esterilidade das fêmeas infectadas (30%), redução do peso dos animais em torno de 15%, aumento do intervalo entre partos, que passa de 12 meses (considerado normal e ideal) para até 20 meses (PAULA et al. 2015).

Em estudo recente sobre perdas econômicas geradas nos rebanhos bovinos de corte e leite acometidos por brucelose, estimou-se prejuízo na ordem de 440 milhões de dólares, além de perdas indiretas relacionadas à doença nos seres humanos, como gastos médicos e perda de produtividade/afastamento de funcionários (PAULA et al. 2015). Suas implicações econômicas geram barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal e perdas para indústria: por condenação do leite e da carne, queda de preços da carne, leite e derivados, desvalorização para o mercado externo, e altos custos com programas de controle, erradicação e pesquisas. A maioria dos países desenvolvidos adotou, há mais de 20 anos, medidas sanitárias destinadas à sua erradicação, obtendo êxito, como Canadá, Dinamarca, Austrália, Inglaterra, Holanda, Suécia e Japão, enquanto outros países, como a França e os Estados Unidos mantêm a mesma controlada, com diminuição de sua ocorrência (MOLNÁR et al., 2000).

No Brasil para efetuar o controle de *Brucella sp.* em rebanhos bovinos e bubalinos, foi regulamentado pelo MAPA, o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose(PNCEBT) com regulamentações de acordo com as particularidades de cada estado da Federação. Para a prevenção de problemas sanitários são mantidos serviços organizados pelo poder público que normatizam os programas de controle. Para a brucelose, tem-se o especificamente o PNCEBT baseado em estudos epidemiológicos, o qual direciona e contribui na definição de políticas públicas e na avaliação do impacto de intervenções, desenvolvendo medidas de saneamento, atendimento médico, suplementação na alimentação, campanhas de vacinação e outras medidas que influenciem no declínio da frequência dos casos ao longo dos tempos de uma determinada patologia (ROUQUAYROL, 2003).

Neste contexto, a Epidemiologia se torna cada vez mais importante na demanda da produção de alimentos para o homem devido ao crescente aumento de percentual de brasileiros que vem deixando as áreas rurais. No período 1970 a 1996, o percentual de brasileiros residentes em áreas rurais

diminuiu de 45% para 12%. Nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, este percentual é ainda mais alarmante: cerca de 90% da população vive em áreas urbanas (MOREIRA, 2002). Com isso, há uma necessidade de aumento da produção agrícola e da pecuária no meio rural sob a responsabilidade de um grupo cada vez menor de produtores, na sua maioria despreparada e não assistidos, por meio de técnicas agressivas e mal manejadas agredindo o meio ambiente prejudicando os seres que por aqui habitam (GARCIA, 2001).

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Brucelose: uma doença endêmica no Brasil

A brucelose tem sido diagnosticada em todas as unidades da federação do Brasil, existindo diferentes prevalências da infecção por *Brucella abortus* entre os estados. Em estudos sorológicos no ano de 1975 realizados pelo Ministério da Agricultura, observaram a prevalência de 4,0% na região sul, 7,5% na região sudeste, 6,8% na região centro oeste, 2,0% na região nordeste e 4,1% na região norte.

No ano 2001 ao instituir o PNCEBT, o MAPA realizou inquéritos soro epidemiológicos, concluindo no ano de 2004 em 13 unidades da Federação (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Distrito Federal), demonstrando que a doença ainda está disseminada em todas as áreas estudadas.

No Estado do Rio de Janeiro, que foi dividido em circuitos pecuários, os resultados não foram diferentes. No circuito pecuário centro oeste onde ficou alocado o município de Paraíba do Sul de acordo com o estudo, que foi realizado o teste de triagem AAT confirmando com 2-ME, as prevalências de focos e de animais encontrada foi de 15,72% [11,9–20,2%] e 2,3% [1,4–3,2%], ou seja, um número próximo de 16% de propriedades infectadas (KLEIN-GUNNEWIEK et al. 2009). Estes valores neste circuito do Estado Rio de Janeiro são preocupantes, por ser uma importante bacia leiteira em décadas passadas, apesar de ter entrado em decadência após o fechamento de

cooperativas captadoras de leite associadas à Cooperativa Central dos Produtores de Leite (CCPL) na década de 1990. Hoje existe uma grande perspectiva de retorno de crescimento com a chegada de grandes empresas como: Nestlé em Três Rios, Vigor em Barra do Piraí, Godan em Sapucaia e Lactális em Barra Mansa, sendo motivadas por políticas públicas para o crescimento da produção leiteira (SEAPEC, 2015).

Em estados com maior expressão na pecuária leiteira, como o Paraná, a prevalência para rebanhos foi de 4% e para animais de 1,7% (PARANÁ, 2001). Na sorologia evidenciou-se a tendência de crescimento da prevalência no sentido centro-oeste/norte do Brasil, tendo um aumento em estados caracteristicamente produtores de carne como Mato Grosso (LAGE et al. 2008).

Dentre o gênero *Brucella*, são descritas seis espécies independentes cada uma com seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus*(bovinos e bubalinos),*Brucella militensis*(caprinos e ovinos),*Brucella suis* (suínos),*Brucella ovis*(ovinos),*Brucella canis*(cães) e *Brucella neotomae*(rato do deserto), e duas novas espécies isoladas de mamíferos marinhos que estão sendo estudadas (BRASIL,2006).

As bactérias do gênero *Brucella*, apesar de permanecerem no ambiente, não se multiplicam nele, sendo medianamente sensíveis aos fatores ambientais, diminuindo a resistência quando aumentam a temperatura e a luz solar direta e se diminui a umidade. A sobrevivência de *Brucella sp.* em esterco líquido é inversamente proporcional à temperatura dele, pois pode sobreviver neste por 8 meses a 15°C,enquanto que só resiste por horas se a temperatura do material for de 45-50°C (BRASIL,2006).

Em bovinos, as estratégias de controle são bastante conhecidas e podem ser resumidas em vacinação, certificação de propriedades livres por testes de rotina, controle de movimentação de animais e sistema de vigilância específico. Os programas de controle atingem bons índices após 20 anos de implantação, sendo programas laboriosos que demandam ações bem coordenadas dos serviços oficiais e privados que trazem como resultados além da eliminação da brucelose o fortalecimento e amadurecimento dos serviços de saúde animal modernizando a cadeia produtiva do leite e carne.

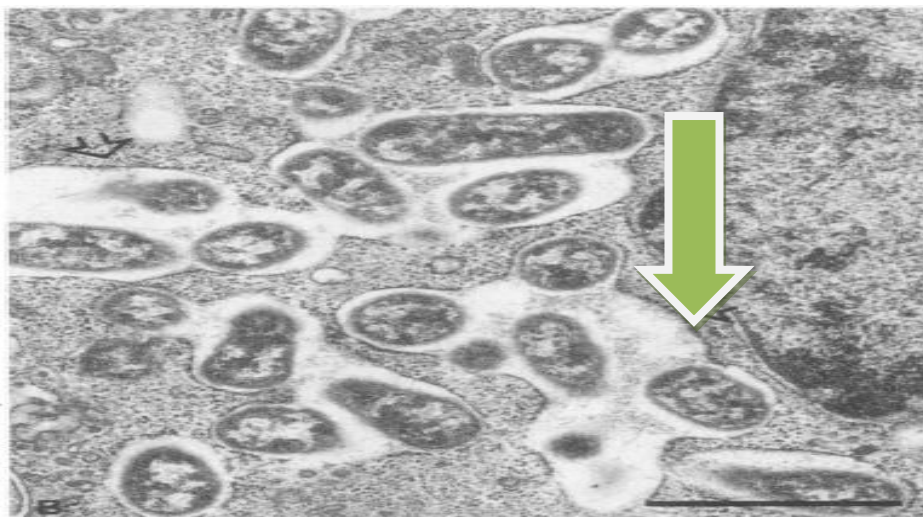


Figura 1- Micrografia eletrônica de *B. abortus* localizado dentro de cisternas de células Vero.

Fonte: BRASIL, 2006.

O médico veterinário por estar englobado nos estudos da ciência num vasto campo, estudando a ocorrência das doenças que acometem os animais, tem um papel relevante na qualidade de vida destes e do homem, principalmente em relação ao consumo de alimentos de origem animal, tais como a carne e leite assim como seus derivados, sendo o único profissional habilitado para exercer o serviço de inspeção, como define o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA:

“Ficam sujeitos à inspeção e reinspeção, previstos neste Regulamento, os animais de açougue, a caça, o pescado, o leite, o ovo, o mel e a cera de abelhas e seus subprodutos derivados”.

A inspeção a que se refere o presente artigo abrange sob o ponto de vista industrial e sanitário a inspeção "ante" e "post mortem" dos animais, o recebimento, manipulação, transformação, elaboração, preparo, conservação, acondicionamento, embalagem, depósito, rotulagem, trânsito e consumo de quaisquer produtos e subprodutos, adicionados ou não de vegetais, destinados ou não à alimentação humana.”

2.2) Patogenia da *Brucella abortus*

Na maioria das vezes a *B. abortus* entra pela mucosa oral e nasal dos hospedeiros, multiplicando-se e sendo fagocitadas. Quando ocorre a entrada pela via digestiva as tonsilas são o principal ponto de multiplicação. Essa localização intracelular é um dos mecanismos de evasão do sistema imune, por proteger a brucela da ação do complemento e de anticorpos específicos. Após a multiplicação, a brucela é transportada livre ou dentro de macrófagos para os linfonodos regionais podendo permanecer por meses, caso não seja destruída ou se tornar localizada. Ocorre a disseminação para outros órgãos pela via linfática ou hematógena, sendo os locais preferenciais os linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero, podendo eventualmente ir para as articulações dando origem as lesões conhecidas como higromas. A infecção do útero gestante ocorre por via hematógena se multiplicando no trofoblasto do placentoma, levando a uma reação inflamatória da placenta, havendo ainda a infecção do feto. As lesões placentárias impedem passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto provocando a infecção do feto, ocasionando o aborto (BRASIL, 2006).

Quanto a sua morfologia e coloração, a *B. abortus* é um bastonete curto que mede entre 0,5 a 0,7 por 0,6 a 1,5µm, sendo tão curtos que podem ser confundidos com cocos, que se arranjam individualmente ou em cadeias curtas. A *B. abortus* é Gram negativa, corando-se com alguma dificuldade pelos corantes comuns. Ela não é álcool ácido resistente, mas pode resistir à descoloração com alguns ácidos fracos, conferindo-a base para algumas colorações especiais tais como de Köster em que o organismo cora-se de vermelho vivo. A *B. abortus* não é móvel, não forma esporos e não possui cápsula bem desenvolvida. Entretanto, a presença desta cápsula pode ser demonstrada em cepas isoladas, utilizando-se corantes especiais para identificação microscópica. São agentes aeróbios estritos precisando da adição de CO₂ a 5-10% para crescer, com temperatura entre 20-40°C com a ótima de 37°C, com pH ótimo de 6,6 a 7,4 sendo patogênicas para os mamíferos multiplicando-se de forma intracelular facultativa (BEER, 1999).

2.3) Ciclo Epidemiológico

A brucelose é uma zoonose que acomete primariamente várias espécies de animais domésticos e silvestres, podendo infectar o homem. De todas as espécies do gênero *Brucella* sp., quatro podem transmitir-se dos animais ao homem, sendo raríssima a transmissão entre pessoas. A *B.melitensis* (biovariedades 1- 3), que infecta caprinos e ovinos, é a mais patogênica para o homem. A presença desta espécie bacteriana nunca foi reconhecida no Brasil.

A *B.suis* (biovariedades 1-5), que infecta primariamente suínos, está presente no Brasil, mas com uma prevalência muito baixa. A *B.abortus* (biovariedades 1-6,9) infecta primariamente bovinos e bubalinos, assim como o homem, sendo a que maiores prejuízos causa à bovinocultura do país, em função da extensão dos rebanhos brasileiros e de áreas com prevalências altas. A *B.canis* é a que apresenta menor patogenicidade para o homem e está bastante difundida no Brasil, especialmente nas grandes cidades (SCHOLZ, 2008).

As formas mais comuns de transmissão de *B. abortus* podem ocorrer por meio do contato ou da ingestão de restos fetais, corrimento vaginal ou placenta de animais previamente contaminados, além da disseminação da brucelose pelo solo e poeira contaminando por meio da inalação, tendo ainda outros vetores mecânicos, além de outros animais e seres humanos facilitando a difusão da infecção por práticas agropecuárias inadequadas (ALVES et al., 2011).

A entrada em rebanhos não infectados ocorre pela estabulação de fêmeas prenhes sem manifestações clínicas e pela compra de vacas aparentemente saudáveis, mas já infectadas, já que animais infectados podem eliminar grandes quantidades de brucela independente de parto e aborto, como leite e fluxo vaginal, contaminando ambiente que dividem com outras vacas e animais, contaminando solos, água, instalações e equipamentos. A probabilidade da transmissão da brucelose de um touro infectado para uma vaca saudável pela monta natural é baixa, devido à imunidade inespecífica, ocorrendo ao contrário pela inseminação artificial pelo fato do sêmen ser depositado diretamente no corpo do útero não passando pelas barreiras naturais (ALVES et al., 2011).

Pode-se afirmar que a principal forma da introdução da doença em uma propriedade livre é por meio da compra de vacas infectadas. A principal porta de entrada da *B. abortus* nos animais susceptíveis é a mucosa do aparelho digestivo (ALVES et al., 2011). Após o contato ou a ingestão, a bactéria chega à corrente sanguínea e aos linfonodos locais. A bacteremia permite a colonização de vários órgãos, tendo maior afinidade por órgãos reprodutores masculinos e femininos. Além da colonização de órgãos reprodutores, a *Brucella sp* possui afinidade pelo tecido mamário, o que explica sua eliminação pelo leite (OTA, 2013).

Existe uma elevada concentração do açúcar eritrol ou eritritol nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas. A *Brucella spp.* possui grande afinidade por este açúcar, fato que explica a predileção por estes tecidos. Além de possuir tropismo por esse açúcar, essas bactérias utilizam produtos da degradação do estradiol e das prostaglandinas para o seu metabolismo. A colonização e a multiplicação bacteriana nos trofoblastos permite que as bactérias acessem diretamente o feto (SMITH et al., 1962).

Em humanos a infecção é caracterizada por um período de incubação que varia de poucos dias até meses, tendo como sinais clínicos febre irregular ou intermitente por períodos variáveis, acompanhados de dores de cabeça, suores profusos, depressão e perda de peso. O não tratamento leva o curso da doença a uma duração variável com tendência à cronicidade. Em função dos sinais difusos da brucelose tanto em humanos como em animais, a suspeita clínica deve ser confirmada por testes sorológicos e de preferência confirmados pelo isolamento e identificação do agente. As fontes de infecção para humanos e as espécies de *Brucella sp* encontradas variam bastante de acordo com as regiões geográficas. As formas mais comuns de infecção humana são devidas à atividade profissional das pessoas envolvidas ou através da ingestão de alimentos infectados conforme ilustrado na figura 2 demonstrado no ciclo epidemiológico da doença (BRASIL, 2006; GRASSO, 2000).

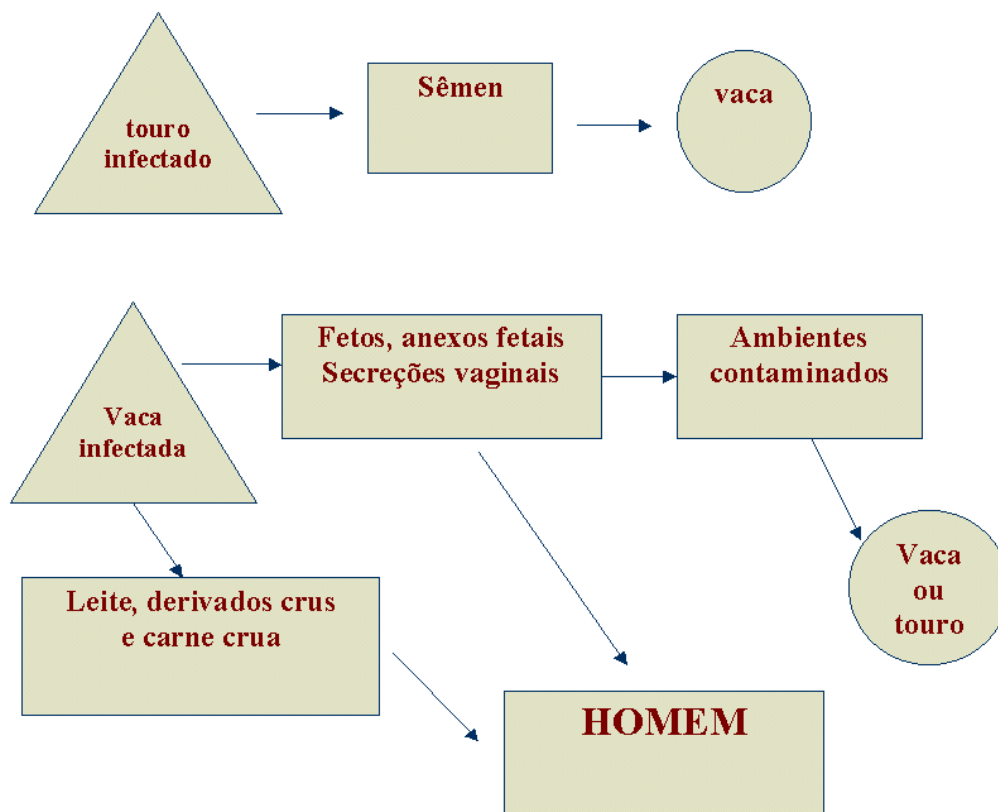


Figura 2- Mecanismo de transmissão da *Brucella ssp.*

Fonte: GRASSO, 2000.

2.4) Prevenção e controle- Amostras vacinas B19 e RB51

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, muitas pesquisas tem procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e não induzam a produção de anticorpos que interfiram no diagnóstico da doença (BRASIL, 2006). Em decorrência desses estudos, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA, com o intuito de produzir um imunógeno que além de prevenir a infecção bacteriana em ambos os sexos, não provoque a doença nos animais vacinados, previna o aborto, promova um longo período de proteção com uma única dose, não interfira nos testes de diagnóstico, seja biologicamente estável e não apresente risco de reverter à virulência, não seja prejudicial aos humanos, não deixe resíduos no leite, e principalmente, que quando produzida em alta escala tenha um baixo custo (OLIVEIRA, 2011).

A experiência no controle da brucelose em nível internacional nos leva ao fato de que regiões com maiores prevalência o combate deve ser iniciado com programas de vacinação das fêmeas com a amostra B19. Atingindo cobertura em torno de 80% das fêmeas em idade de procriar é possível baixar a prevalência a menos de 2% nos rebanhos. No intuito de baixar a prevalência de brucelose, o PNCEBT estabeleceu que os Estados implantassem num prazo máximo até dezembro de 2013 em todos os seus territórios a obrigatoriedade da vacinação de bezerras com idade entre 3 e 8 meses (BRASIL, 2006). Um segundo passo, seria a suspensão da vacinação e intensificação da certificação de propriedades livres através de exames sorológicos consecutivos de rebanhos, efetuando a eliminação de bovinos soropositivos através de sacrifícios sistemáticos até atingir a condição livre, e assim obter 99,8% das propriedades certificadas como livre. Somente atingindo estes índices, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) considera como livre uma dada região ou país, devendo ser mantida por meio de renovação permanente dos certificados por testes e estruturação permanente do sistema de vigilância para prevenção e atuação em eventuais focos que podem resultar em reinfecção de propriedades livres (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; POESTER, 2006; LAGE et al., 2008).

Como estratégias de prevenção e controle da brucelose, a base do processo é a redução constante do número de focos da doença, além do controle do trânsito de animais destinados a reprodução e os processos de certificação de propriedades livres da enfermidade por meio do diagnóstico, sacrifício dos animais positivos e a adoção de medidas ambientais e de programas de vacinação (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A vacinação visa baixar a prevalência da doença a custos mais baixos. A amostra B19 é a regulamentada pelo programa de erradicação da enfermidade no Brasil. Ela é amplamente empregada nos programas de controle da brucelose em diversos países, inclusive no Brasil, e obrigatória para todas as fêmeas com idade entre 3 e 8 meses de idade (BRASIL, 2006), sendo compulsória sua adesão aos criadores do estado do Rio de Janeiro desde 2003 (SEAPEC, 2015). Esta obrigatoriedade é regulamentada além da adoção de medidas sanitárias e profiláticas visando baixar a prevalência e incidência da

brucelose bovina e bubalina no Estado do Rio de Janeiro. A vacinação é regulamentada pela Resolução SEAPPA de 02/07/2008 que diz:

“Art. 1º- *Ficam os criadores obrigados a apresentar, semestralmente, nos meses de maio e novembro, perante os Núcleos de Defesa Agropecuária desta Secretaria de Estado, a comprovação de vacinação contra Brucelose, conforme estabelecido a seguir:*

Art. 2º- *A vacinação de fêmeas das espécies bovina e bubalina, na faixa etária de 03 (três) a 08 (oito) meses, utilizando a vacina contra brucelose – amostra B19.*

Art. 3º- *A vacinação de fêmeas das espécies bovina e bubalina, utilizando a vacina contra brucelose não indutora da formação de anticorpos aglutinantes - amostra RB51, será recomendada nos seguintes casos:*

I - *idade superior a 8 (oito) meses e que não foram vacinadas com a amostra B19 entre 3 (três) e 8 (oito) meses de idade; ou*

II - *adultas não reagentes aos testes diagnósticos, em estabelecimentos de criação com focos de brucelose.*

A vacina B19 é produzida com amostra viva atenuada da *B. abortus* bv. 1 estirpe B19, tendo como características: uma única dose nas fêmeas entre três e oito meses de idade deve conferir imunidade prolongada; prevenir o aborto; ser estável e não se multiplicar na presença de eritritol; ser atenuada para bovinos, causar reações mínimas após a sua aplicação, além de conferir proteção em 70-80% dos animais vacinados (BRASIL, 2006; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A idade vacinal tem que ser rigorosa, pois está relacionada com a persistência de anticorpos, devendo ainda ser aplicada somente em fêmeas com até 8 meses de idade. Após esta idade, existe a probabilidade de uma grande produção de anticorpos que podem perdurar e interferir no diagnóstico da doença mesmo após os 24 meses de idade. Machos ou fêmeas em

gestação não podem ser vacinados, devido à virulência residual que a cepa conserva, levando machos a permanecerem com títulos vacinais por longos períodos, além da possibilidade de desenvolvimento de orquite e artrites. Já em fêmeas prenhes, a vacina pode provocar o aborto, principalmente no terço final da gestação (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

Com o objetivo de obter uma amostra vacinal que não provocasse a indução de anticorpos vacinais, foi desenvolvida a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51, que é quase totalmente isenta de cadeia O, obtida por passagens sucessivas da cepa 2308 de *B. abortus* em meios de cultura contendo rifampicina, originando uma mutante permanentemente rugosa, reduzindo sua virulência. A amostra RB51 possui características de proteção semelhantes à B19, porém, por ser rugosa, previne a formação de anticorpos reagentes nos testes sorológicos de rotina, não interferindo, portanto, no diagnóstico sorológico da enfermidade (POESTER, 2006; LAGE et al., 2008). Sua utilização no Brasil está restrita a vacinação estratégica de fêmeas adultas e para aquelas que não foram vacinadas com amostra B19 entre 3 e 8 meses, podendo ser recomendada ainda para propriedades foco da doença para fêmeas adultas negativas aos testes de triagem (BRASIL, 2006).

Na figura 3 é representado o título de anticorpos em fêmeas bovinas vacinadas com amostras B19 ou infectadas com amostra patogênica. A resposta humoral destes bovinos é caracterizada pela síntese dos quatro isotipos principais de imunoglobulinas. A partir da primeira semana a resposta sorológica pós-infecção ou vacinação aparece em primeiro lugar o isotipo IgM e, logo após, o IgG1. Já as respostas de IgG2 e IgA aparecem mais tarde, aumentando gradativamente, mas permanecem em níveis baixos.

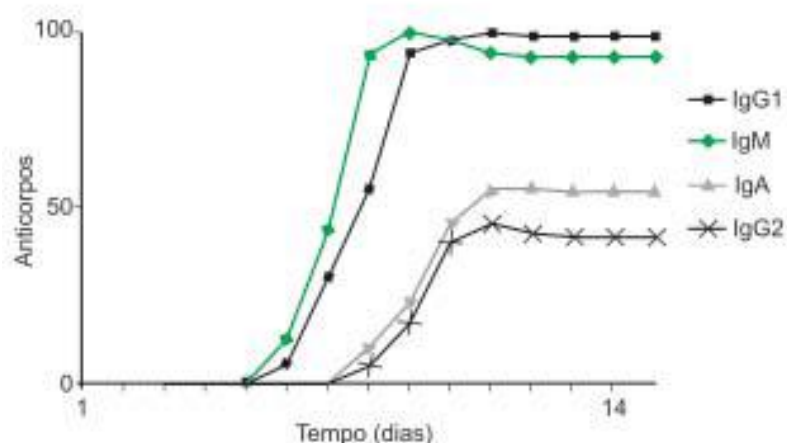


Figura 3- Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos infectados por amostra patogênica *Brucella abortus* ou vacinados com amostra B19.

Fonte: Adaptado de Nielsen et al., 1996(MAPA, 2006).

A observação por período prolongado da resposta humoral constata-se a ocorrência de um decréscimo dos níveis de IgM, enquanto os de IgG1 permanecem altos. A IgG2 e IgA permanecem em níveis mais baixos e estáveis.

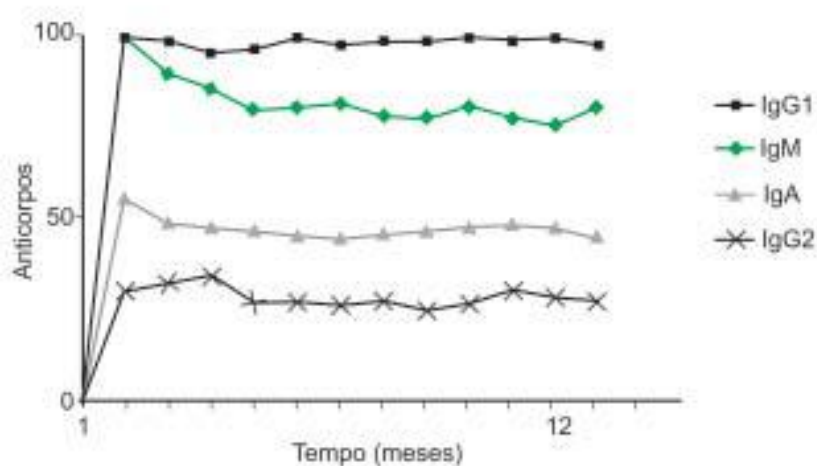


Figura 4- Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos infectados por amostra patogênica *Brucella abortus*.

Fonte: Adaptado de Nielsen et al., 1996(MAPA, 2006).

Em animais vacinados com B19, quando vacinados até 8 meses, demonstra que o nível de anticorpos decresce rapidamente, atingindo títulos inferiores a 25 UI depois de 12 meses, e como este título vai baixando ao longo

do tempo, devem-se tomar medidas para prevenção dentro de rebanhos além da vacinação (BRASIL, 2006).

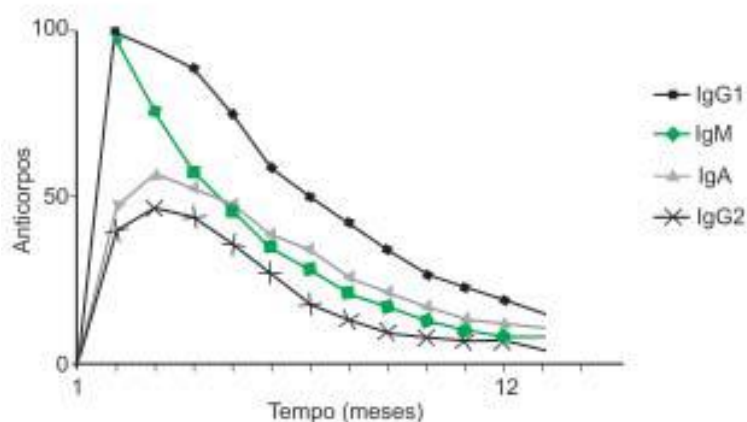


Figura 5- Resposta dos isotipos de anticorpos em bovinos vacinados com amostra B19 de *Brucella abortus*.

Fonte: Adaptado de Nielsen et al., 1996(MAPA, 2006).

2.5) Sintomas nos seres humanos

A brucelose é uma doença infectocontagiosa que essencialmente afeta os animais domésticos. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, em que a doença é caracterizada por febre aguda, tendo evolução para a forma crônica, ocorrendo inicialmente o aparecimento de febre ondulante, acompanhada de mal estar, anorexia, prostração, dores de cabeça e dores articulares. Este período de incubação, que varia de 2-3 semanas, é seguido de aparecimento de febre (acima de 38°C), sudorese intensa, predominantemente noturna e dor. Já nos animais domésticos, ocorre placentite seguida de aborto, principalmente no terço final da gestação, nascimentos de prematuros, epididimite e orquite (CORBEL et al., 2006).

As principais fontes de infecção de *Brucella sp* ao ser humano são placentas, fetos abortados, secreções vaginais, tecidos, sangue e leite de animais infectados, sendo o principal modo de transmissão o contato com tecidos infectados (BRASIL, 2006). Foi observado que a ingestão de produtos lácteos de animais infectados foi a via de transmissão mais comum ao homem,

sendo os principais alimentos implicados na transmissão leite cru e queijos processados com leite cru (NAMIDURU et al. 2003).

2.6) Sinais clínicos nos animais

Já nos animais infectados, quando atinge o ambiente uterino, a multiplicação de *Brucella* sp. desencadeia uma reação inflamatória de placentomas evoluindo para necrose e deposição de fibrina entre as vilosidades, provocando abortos, aderência e retenção de placenta. Com o útero não gravídico após o aborto, mais ou menos duas semanas após, este se torna menos susceptível a *B. abortus*, e outros órgãos em atividade são colonizados como, por exemplo, a glândula mamária e linfonodos supramamários, onde o patógeno permanecerá durante toda a vida útil do animal infectado, formando granulomas microscópicos no parênquima mamário e sendo excretada constante ou intermitentemente pelo leite durante as lactações (PAULIN, 2006; (CORBEL et al., 2006). Estes úberes permanecem clinicamente sadios e normais se tornam uma importante fonte de infecção para bezerros e para o ser humano, que ingere o leite cru e seus derivados, como coalhadas e queijos artesanais (ALVES et al., 2011).

Em machos, inicialmente observa-se a perda de qualidade do sêmen com diminuição da motilidade e concentração, além de anormalidades dos espermatozoides como defeitos de cauda e cabeça. Posteriormente, lesões palpáveis podem ser observadas na bolsa escrotal, sendo observadas principalmente no epidídimo, túnica vaginal e testículos, ocorrendo desde um leve aumento de epidídimo até extensas indurações. Existe a tendência para epididimite unilateral, em vez de bilateral. Sendo assim, na fase inicial, ocorre deterioração do sêmen, que pode apresentar, além disso, glóbulos de pus e o próprio agente causal, aparecendo sinais de inflamação aguda, com edema na bolsa escrotal, simultaneamente com febre, enfraquecimento e taquipneia. Na fase crônica, as lesões podem ser determinadas pela palpação do epidídimo, formando-se espermatocele, fibrose e aderências. O testículo pode estar atrofiado, com fibrose e calcificação (MAGALHÃES NETO, 1996; CORBEL et al., 2006).

2.7) A resistência do gênero *Brucella* e o contágio pela brucelose

O crescimento de *B. abortus* fora da célula dos mamíferos hospedeiros não tem importância na epidemiologia da doença, pois ela não se multiplica fora dos animais e somente persiste no ambiente. A viabilidade dela fora do hospedeiro é influenciada pelas condições ambientais. A sua viabilidade é aumentada em temperatura mais amena e umidade, sendo diminuída quando há alta temperatura, luz solar direta e dessecamento. Outro exemplo é a sobrevivência dela em esterco líquido que é inversamente proporcional à temperatura dele, podendo sobreviver neste material por 8 meses a 15°C, enquanto só resiste por 4 horas se a temperatura for de 45°C-50°C. Outras formas ambientais estão representadas na tabela 1.

Ambiente		Tempo
Luz direta		4,5 h
Solo seco		4 dias
Solo úmido		65 dias
Solo a baixas temperaturas		151-185 dias
Fezes		120 dias
Dejeto	Esgoto	8-240/700 dias
	Altas temperaturas	4 horas-2 dias
Água	Potável	5-114 dias
	Poluída	30-150 dias
Feto à sombra		180 dias
Exsudato uterino		200 dias

Tabela 1- Resistência de *Brucella* sp. em algumas condições ambientais em relação ao tempo.

Fonte: Adaptada de BRASIL, 2006.

A prevalência da brucelose bovina é variável em bovinos, mas geralmente é maior entre gado leiteiro devido às práticas de pecuária intensiva a que esses animais são submetidos. No Brasil, a prevalência da doença em bovinos indica que 2,49% dos soropositivos e 2,04% apresentam resultados suspeitos (LANGONI et al. 2000).



Figura 6- Mapa da prevalência da brucelose no rebanho bovino do Brasil no ano de 2002.

Fonte: POESTER, 2009.

A doença é mais grave ainda pelo fato de ser considerado um dos agentes etiológicos causadores da mastite. Na mastite brucélica ela se apresenta de forma crônica e muitas vezes clinicamente inaparente. A *Brucella sp.* é excretada pela glândula mamária de fêmeas infectadas a qual permanece viável no leite durante meses ou anos. Estas glândulas mamárias aparentemente normais acabam por representar importantes fontes de infecção, não apenas para outras vacas em lactação, mas também para os bezerros e humanos que consomem leite cru. A *B. melitensis* já foi isolada de amostras de leite de animais brucélicos, demonstrando que, o micro-organismo pode permanecer em latência em sua maioria comumente nos tecidos do úbere e no linfonodos supramamários. Com isso é observado um aumento significativo na prevalência de brucelose humana associada ao consumo de leite cru, comprovando ainda que a principal fonte de infecção para o consumidor não está apenas no leite cru contaminado, mas também produtos lácteos não pasteurizados (LANGONI et al. 2000).

O agente pode sobreviver no alimento processado dependendo dos períodos de maturação e acidificação a que cada produto é submetido (LANGONI et al. 2000). Esta mastite provoca também alterações nos três

principais componentes do leite: gordura, proteína e lactose. Enzimas e minerais também são afetados. A extensão do aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS) e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite. Em relação às proteínas ocorre uma redução naquelas sintetizadas na glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) e aumento das proteínas de origem sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas), em virtude do aumento de permeabilidade vascular secundário ao processo inflamatório. A proteína total do leite tem pouca variação, mas a concentração de cada tipo de proteína varia acentuadamente (SANTOS, 2002).

A qualidade de grande parte dos produtos lácteos e do leite industrializado está diretamente relacionada com a qualidade microbiana do leite cru utilizado como matéria-prima advindos das propriedades. De acordo com a temperatura, condições e extensão da estocagem do leite, vários grupos de micro-organismos podem passar por um período de crescimento intensivo, produzindo altas concentrações de enzimas, particularmente lipases e proteinases (BURTON, 1988).

As espécies da bactéria causadora da doença são inativadas pela pasteurização a 72°C entre 10 e 15 segundos, pela pasteurização lenta por 30 minutos a 65°C, e também pelo tratamento pela temperatura ultra-alta (UAT/UHT), na qual o aquecimento é realizado em temperaturas de 130 a 150°C por 2 a 4 segundos. Na preocupação por um alimento seguro e de qualidade, e pela falta de controle nas indústrias, infelizmente para corrigir problemas de higiene e sanidade ocorrem falhas nestes processos. Como exemplo um superaquecimento no UHT, que pode ser responsável pela desagregação das micelas de caseína, resultando em um aumento do índice proteolítico e alterações das propriedades reológicas do leite principalmente ao longo do seu tempo de estocagem. Neste processo o ponto de maior controle é o binômio tempo-temperatura, que possibilita a esterilização comercial, que temperaturas abaixo da estabelecida são indesejáveis e acima podem causar problemas tecnológicos como alterações das proteínas, interferindo no sabor,

geleificação, formação de sedimentos, perda do valor nutricional e escurecimento (BASTOS, 1999; BURTON, 1988).

As *Brucellas sp.* são ainda destruídas rapidamente pelos desinfetantes comuns como o cresol 3%; hidróxido de sódio a 2%; compostos de ortofenóis 3-5%; mercuriais e álcool 70%. A sobrevivência de *Brucella sp.* no leite e derivados é dependente de fatores como temperatura, pH e da presença de outros micro-organismos que possam inibir a multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a sua viabilidade permanece mesmo em temperatura de congelamento. Felizmente, a fervura, processos de pasteurização e os métodos de esterilização são eficazes na eliminação, mas para isso é preciso ser cauteloso na aplicação dos métodos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil. De modo geral, o controle da qualidade do leite nas últimas décadas tem se restringido à prevenção de adulterações do produto *in natura* baseada na determinação da acidez, índice crioscópico, densidade, percentual de gordura e extrato seco desengordurado. A contagem global de micro-organismos aeróbios mesófilos (indicadores de qualidade microbiológica do produto) tem sido utilizada somente para leite cru de tipos especiais e por indústrias especializadas por seus programas de qualidade (FONTANESI, 2012).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite para ser consumido *in natura* como para ser industrializado deve ser pasteurizado, exceto quando destinado à fabricação de queijos com maturação acima de 60 dias (BRASIL, 1952). Os queijos frescos fabricados com leite cru mantêm as bactérias pré-existentes, incluindo eventuais micro-organismos patogênicos. A *Brucella sp* eventualmente presente nos queijos se reduz gradualmente durante o processo de maturação, mas para que o alimento se torne seguro isto pode levar alguns meses (FONTANESI, 2012).

Estudos sobre a presença e sobrevivência da *Brucella sp* em alimentos têm sido realizados em diversos países ao longo dos anos com resultado variado, e foi confirmado que na presença de produtos com teores de gordura elevados sua permanência se torna favorável, comprovado quando cepas que foram inoculadas em manteigas armazenadas a 8 °C permaneceram viáveis por 81 dias (FONTANESI,2012).

É importante atentar-se aos resultados de trabalhos anteriores, onde foram coletadas diariamente amostras de leite de vacas sorologicamente positivas para a doença, coletou-se destas amostras diárias de leite. Examinando 49 amostras deste perfil, conseguiu-se obter os biótipos: biotipo 1 em uma amostra (2,04%), biotipo 2 em oito (16,32%) e biotipo 3 em seis amostras (12,25%). Isolou-se *Brucella abortus* em 15 (30,61%) amostras (LANGONI et al. 2000). Estes dados se tornam importantes por existir em nosso meio, principalmente no interior, a cultura do consumo de leite e subprodutos não pasteurizados, e sabendo que o gênero *Brucella* resiste às condições adversas do ambiente incluindo extremos de pH, temperatura e luz solar direta, e por resistir seis meses ou mais na água, em pastos contaminados, dentre outros. No leite e derivados, mantêm-se viáveis por vários meses. No entanto, a fervura e temperaturas usuais de pasteurização destroem o micro-organismo, sendo importante este tipo de orientação (PAULIN, 2003).

2.8) Implantação de programas de controle

Os programas de controle e erradicação foram instituídos em muitos países a partir de 1930, sendo o principal motivo fundamentado nos grandes prejuízos econômicos e na importância para a saúde pública. A elaboração de programas deve se pautar em planejamento das ações de forma regionalizada (PAULIN, 2003).

Baseado nos dados epidemiológicos e estatísticos foi demonstrado que em regiões com altas prevalências da doença, o controle deve se iniciar com programas em massa de vacinação, iniciando com a amostra B19, considerando que atingindo índice vacinal de fêmeas próximo de 80% chega-se a baixar a prevalência de 2% nos rebanhos. Para isso é necessário

conhecer a situação, por duas razões principais: como será a estratégia de identificação da frequência e distribuição da doença na população a ser estudada e como será o acompanhamento do programa com vistas a possíveis correções, evitando perda de tempo e de recursos (BRASIL, 2006).

Para se chegar ao diagnóstico da maioria das doenças infecciosas, um dos fatores mais importante é o isolamento por meio do cultivo, com posterior identificação do patógeno. Assim, na atualidade, somente é possível dizer que uma enfermidade infecciosa é diagnosticada com segurança depois do isolamento e identificação do agente. No entanto, para o caso da brucelose isso não é comum, por ser um processo lento e muito oneroso, principalmente pela necessidade de investigar muitos animais nos programas de vigilância, por se tratar de uma doença complexa, exigindo tempo para o isolamento e identificação levando na média de 7 a 14 dias. Seu manuseio como rotina pode ser um trabalho perigoso, pois é uma doença infecciosa, devendo-se ter laboratórios especializados por se tratar de zoonose com alto risco de infecção ao ser humano e contaminação do ambiente. Assim as provas sorológicas ganham destaque no diagnóstico da enfermidade, sendo a mais usual e preconizada pelo programa a do Antígeno Acidificado Tamponado-AAT (JARDIM et al. 2006).

Este diagnóstico sorológico pode ser realizado por médico veterinário habilitado e por laboratórios credenciados, e ainda por instituições de ensino e pesquisa, sendo um processo facilitador para o andamento do programa e saneamento de rebanhos (MEGID et al., 2000).

2.9) Métodos de diagnóstico

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da doença, destacam-se como os mais amplamente utilizados, os métodos chamados indiretos ou sorológicos. Estes métodos demonstram a presença de anticorpos contra *Brucella sp* em vários fluídos corporais como leite, sangue, muco vaginal e sêmen. Eles deveriam detectar a infecção no estágio inicial da doença, antes de abortos e ainda discriminar anticorpos de vacinação e de infecção, e ainda não apresentar reações falso-positivas ou negativas. Infelizmente ainda não

existe este teste para brucelose e outras doenças este recurso de tal desempenho (MEGID et al. 2000; BRASIL, 2006).

Testes sorológicos baseiam-se na reação entre antígenos de *Brucella* sp, células inteiras inativadas ou suas frações purificadas, e anticorpos produzidos em resposta a uma infecção. Anticorpos produzidos por espécies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) fazem reação cruzada com antígenos preparados com amostras lisas. Geralmente *B. abortus*, e anticorpos produzidos por espécies rugosas de *Brucella* (*B. ovis* e *B. canis*) fazem reação cruzada com antígenos produzidos com amostras rugosas, geralmente *B. ovis* (NIELSEN, 1996; POESTER et al., 2005).

Para o caso da brucelose, ocorrem ainda as reações falso-positivas, as quais são decorrentes de 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.. Outra possibilidade é resultante da vacinação com amostra B19 fora da idade recomendada de 3 a 8 meses das fêmeas. Nestes casos os testes sorológicos de triagem e confirmação são amplamente utilizados em países que combatem a patologia, sendo classificados segundo o antígeno utilizado na reação (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

No Brasil o teste mais utilizado como triagem é o teste de soro aglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Este é preparado com 8% de concentração tamponado em pH ácido(3,65) e corado com Rosa de Bengala. A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Quando se suspeitar de falso-positivos devido a B19 sugere-se testes confirmatórios como teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME). O AAT é um teste qualitativo não indicando o título de anticorpos do soro testado, a leitura revela a presença ou ausência de IgG1, em que o pH acidificado inibe a aglutinação do antígeno pelas IgM, detectando ainda com precocidade as infecções recentes comparadas a outras provas(BRASIL,2006).

Dentre os testes utilizados no país, tem-se: Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAT), Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Rivanol, Fixação de Complemento (FC) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA (MEGID

et al. 2000). Já ficou demonstrado que quando avaliados comparativamente os resultados, todos apresentaram boa concordância quando considerada a interpretação preconizada pelo MAPA. Quando comparadas as provas de AAT e 2-ME, estas apresentam alta concordância. O uso do AAT é proposto então como teste padrão de triagem para diagnóstico da brucelose em virtude da alta sensibilidade, especificidade, praticidade e baixo custo, não sendo necessário o envio de muitas amostras a laboratórios especializados. Isto possibilita aos médicos veterinários habilitados realizarem os testes com precisão, rapidez e segurança, eliminando realmente aqueles animais soropositivos aos testes, realizando o saneamento de rebanhos, sendo possível a realização próxima aos centros criadores (MEGID et al. 2000; BRASIL, 2006).

Na figura 7 é representado o título de anticorpos em bovinos infectados com *Brucella abortus* ao longo do tempo, mostrando que há um leve decréscimo dos níveis de Em, enquanto de IgG1 permanecem inalterados e as IgG2 e IGA permanecem em níveis mais baixos e estáveis.

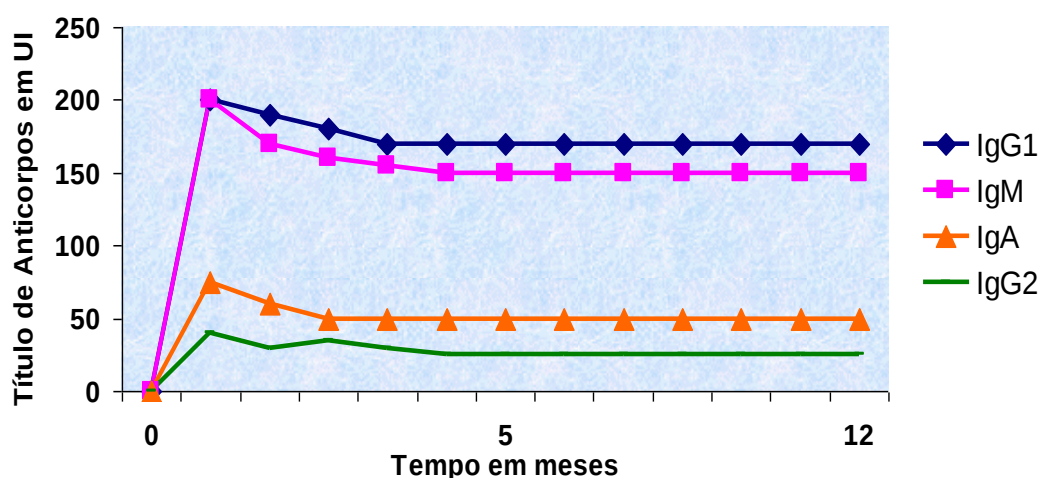


Figura 7-Título de anticorpos em bovinos infectados por *B. abortus*.

Fonte: Adaptado de Nielsen et al., 1996.

Diante da grande quantidade de testes disponíveis para o diagnóstico de *Brucella* spp, foi necessário o MAPA definir os testes oficiais a serem usados no território nacional, sendo eles: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Anel do Leite (TAL), como testes de triagem e o 2-Mercaptoetanol (2-ME) e a Fixação de Complemento (FC) como confirmatório (BRASIL, 2006).

2.9.1) Método Antígeno Acidificado Tamponado-AAT

O AAT é preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. O AAT detecta com maior precocidade as infecções recentes, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos (BRASIL, 2006). Esse método, também conhecido como teste rosa de Bengala e ou “card test”, deve ser realizado conforme a técnica recomendada no Manual do PNCEBT (BRASIL, 2006), que consiste em colocar 0,03 mL do soro em contato com 0,03 mL do antígeno, em uma placa de vidro quadriculada, homogeneizar e manter a placa em movimentos rotatórios lentos e constantes até o momento da leitura após quatro minutos de reação, observando, com o auxílio de uma caixa com luz se há ocorrência dos grumos de aglutinação (resultado positivo) ou não (resultado negativo). O antígeno empregado nessa técnica é preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, corado com rosa de Bengala.

2.9.2) Teste do Anel em Leite-TAL

O TAL na maioria das vezes é aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Se existirem anticorpos no leite, eles se combinarão com *Brucella sp*, que é caracterizado pela formação de uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite, caracterizando a reação positiva. Não havendo anticorpos presentes, o anel de creme terá a coloração branca e a coluna de leite permanecerá azulada caracterizando reação negativa. A prova do TAL apesar de prática e usual, possui limitações, a qual apresenta resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de animais portadores de mastites e ainda de animais em início de lactação produzindo o colostro nesta fase (BRASIL, 2006).

2.9.3) Método 2-Mercaptoetanol- 2-ME

O 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 (SAL) em tubos, que se baseia no fato dos anticorpos da classe IgM, degradar-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Estas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Dessa forma, soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME. Os resultados positivos na prova lenta e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com B19. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais serem considerados infectados (BRASIL, 2006).

2.9.4) Fixação de Complemento-FC

A FC tem sido empregada em países que estão em fase de erradicação ou conseguiram erradicar a brucelose. É considerado o teste de referência pela Organização Mundial de Epizootia (OIE) para o trânsito internacional de bovinos. Detecta tanto IgG1 como IgM. Em animais vacinados acima de 8 meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente do que os aglutinantes (BRASIL, 2006).

2.10) A prevenção das doenças e a Educação Sanitária em Defesa Agropecuária

Para auxiliar a cadeia produtiva da pecuária brasileira, ampliando a forma de educação agropecuária, passando não apenas o ensino formal, e regulamentar as parcerias entre os seguimentos de interesse para a saúde coletiva, foi criada a Instrução Normativa Nº 28 de 15 de maio de 2008, que regulamenta o Programa Nacional de Educação Sanitária em Defesa Agropecuária, que em seu artigo 3º cita seus objetivos específicos:

“I - estabelecer e implementar diretrizes nacionais para as atividades de educação sanitária em Defesa Agropecuária;

II – promover o fortalecimento, aumento da abrangência e aperfeiçoamento das ações públicas e privadas orientadas para a Educação Sanitária em Defesa Agropecuária; e

III – desenvolver e implementar, de forma continuada, planos, programas, atividades e ações em educação sanitária em Defesa Agropecuária, de forma articulada com as três Instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), com os Sistemas Brasileiros de Inspeção de Produtos e Insumos Agropecuários.”

Ainda sobre esta Instrução Normativa, a qual prioriza algumas diretrizes, dentre elas uma muito importante que deve ser trabalhada visando a propagação das boas informações, o Artigo 7º diz: O Programa Nacional de Educação Sanitária em Defesa Agropecuária prioriza:

“IV- formação de multiplicadores para atuarem junto ao público-alvo quanto a orientações e procedimentos sanitários básicos relacionados a temas específicos da defesa agropecuária, por meio de:

a) capacitação de professores quanto a noções básicas de temas relacionados à defesa agropecuária para a sua abordagem com alunos de instituições de ensino fundamental, médio e superior, principalmente em comunidades rurais e cursos técnicos e superiores de áreas afins, e

b) formação de agentes de saúde agropecuária e de multiplicadores, para atuarem como vigilantes sanitários e promotores de ações primárias relacionadas à sanidade agropecuária, sendo esses preferencialmente membros da comunidade e capazes de influenciar positivamente os demais moradores da região onde vivem.”.

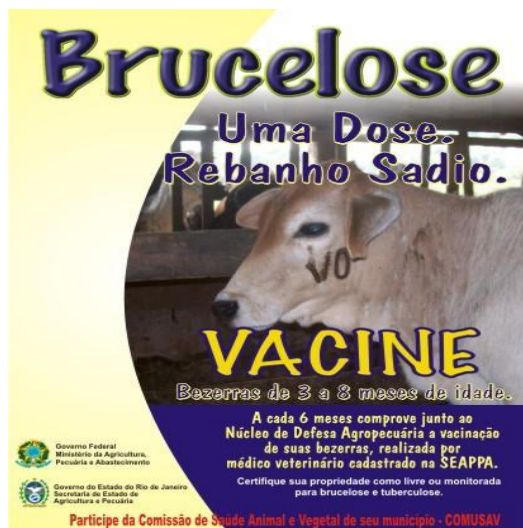


Figura 8 – Folder vacinação de fêmeas entre 3 e 8 meses contra brucelose-educação sanitária.

Fonte: SEAPEC, 2015.

Através desta Instrução, a proposta é trabalhar os temas de forma integrada com os diferentes seguimentos da sociedade para promover a melhoria da saúde humana e da qualidade do ambiente. Assim é possível mudar o quadro de notificações de zoonoses ocorridas em regiões ricas de informações, diminuindo drasticamente a ocorrência através da prevenção.

Fazer Educação Sanitária em Defesa Agropecuária é uma das formas mais eficientes e viáveis de auxiliar os órgãos de Defesa Agropecuária para se evitar e disseminação de pragas e doenças. A ideia dos projetos de Educação Sanitária em Defesa Agropecuária é se formar multiplicadores, onde se aproveita a experiência dos participantes, envolvendo toda a comunidade em questão, sejam associações, sindicatos, igrejas e escolas públicas e privadas. Fazendo uma extensão do conhecimento, pelo auxílio dos membros das escolas e da comunidade, e com a participação dos alunos possibilitando retornos favoráveis mais rápidos, pois, alunos em formação são excelentes assimiladores e propagadores da informação desejada (ALBUQUERQUE, 2005).

2.11) Divisão político administrativa do Estado do Rio de Janeiro

O Estado do Rio de Janeiro está dividido em micro e macro regiões. Estas divisões facilitam as promoções dos projetos para desenvolvimento

regional como proposto por PAULIN (2003), e para direcionar trabalhos relacionados à saúde pública e sanidade animal, estando Paraíba do Sul inserida na região centro sul fluminense pertencendo ao Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios. O município é caracteristicamente rural com predominância da pecuária leiteira, onde ainda não são difundidas muitas tecnologias nas propriedades de pequeno e médio porte com mão de obra tipicamente familiar (IBGE, 2008; SEAPEC, 2015).

REGIÃO	MUNICÍPIOS PERTENCENTES
Metropolitana	Paracambi, Seropédica, Japeri, Queimados, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Magé, Guapimirim, Niterói, Itaboraí
Baixas Litorâneas	Marica, Cachoeiras de Macacu, Rio Bonito, Silva Jardim, Saquarema, Araruama, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio, Casimiro de Abreu, Rio das Ostras
Baía da Ilha Grande	Angra dos Reis, Mangaratiba, Itaguaí
Centro-sul Fluminense	Vassouras, Miguel Pereira, Paty do Alferes, Paraíba do Sul, Comendador Levy Gasparian, Três Rios, Areal, Sapucaia
Médio Paraíba	Resende, Quatis, Barra Mansa, Volta Redonda, Barra do Piraí, Piraí, Rio Claro, Valença, Rio das Flores
Serrana	Petrópolis, Teresópolis, São José do Vale do Rio Preto, Sumidouro, Nova Friburgo, Duas Barras, Bom Jardim, Carmo, Cantagalo, Cordeiro, Macuco, São Sebastião do Alto, Trajano de Moraes, Santa Maria Madalena
Noroeste Fluminense	Itaocara, Aperibé, Santo Antônio de Pádua, Cambuci, Miracema, São José de Ubá, Italva, Laje do Muriaé, Itaperuna, Natividade, Bom Jesus do Itabapoana, Porciúncula, Varre-Sai
Norte Fluminense	Macaé, Conceição de Macabu, Carapebeus, Quissamã, Campos dos Goytacazes, São Fidélis, São João da Barra, Cardoso Moreira, São Francisco de Itabapoana

Tabela 2- Divisão político administrativa do Estado do Rio de Janeiro
Fonte: CIDE, 2007.

2.12) Municípios do Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios

De acordo com as características regionais de acordo com a produção agrícola e pecuária do estado do Rio de Janeiro, foi criado pela Secretaria de Agricultura e Pecuária e reconhecido pelo MAPA, a divisão por unidade avançada de Defesa Agropecuária, conforme a tabela 3 Paraíba do Sul fica locada junto ao núcleo de Três Rios.

NDA	Três Rios, Areal, Comendador Levy Gasparian, Sapucaia e Paraíba do Sul.
------------	--

Tabela 3-Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios

Fonte: SEAPEC, 2013.

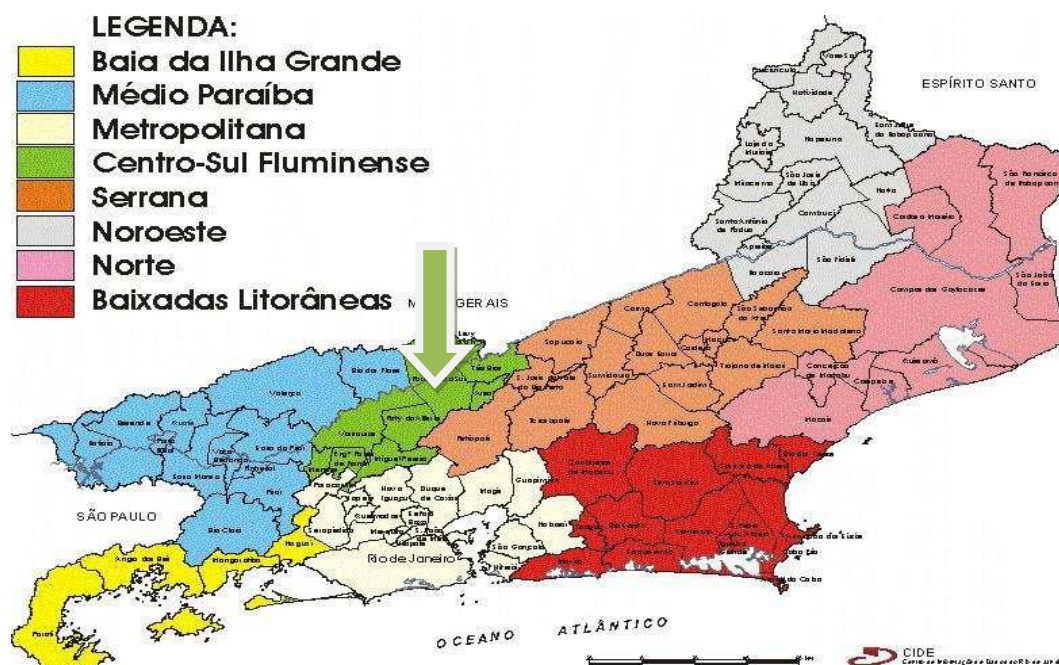


Figura 9: Mapa da Divisão Político Administrativa do Estado do Rio de Janeiro.

Fonte: CIDE, 2007.

2.13) Habilitação de médicos veterinários para atuação PNCEBT

Para a realização dos testes de triagem, o PNCEBT habilita médicos veterinários autônomos que foram aprovados nos cursos de treinamento em métodos de diagnóstico e controle de brucelose e tuberculose, previamente reconhecido pelo MAPA. Esses profissionais após realização dos referidos testes diagnósticos nas propriedades, têm o dever de fazer a comunicação de animais e rebanhos positivos para brucelose aos órgãos de Defesa Sanitária

Animal Estadual. Cabe aos órgãos de Defesa Sanitária Animal dos estados o controle do trânsito de animais destinados à reprodução, e à aplicação de normas sanitárias para a participação em exposições, feiras, leilões e em outras aglomerações de animais. Compete ainda o controle da venda dos antígenos para os testes de triagem, a realização dos testes confirmatórios, sacrifício dos animais testados positivos e a Certificação de Propriedades Monitoradas ou Livres para Brucelose (BRASIL, 2006).

Em propriedades certificadas monitoradas para brucelose, os testes são realizados apenas em fêmeas com mais de 24 meses e em machos reprodutores anualmente, podendo só ingressar nestas propriedades animais com dois testes negativos consecutivos ou provenientes de propriedades de condição sanitária igual ou superior (BRASIL, 2006). Caso não forem detectados animais reagentes positivos, a propriedade receberá o certificado de monitorada para brucelose, e se forem encontrados animais reagentes positivos, os animais não incluídos na amostragem serão submetidos a testes de diagnóstico, e todos os animais reagentes positivos serão sacrificados ou destruídos. Somente após essa etapa a propriedade receberá o certificado de monitorada para brucelose (BRASIL, 2006; PAULIN, 2003).

Para certificação de livre de brucelose, a metodologia consiste na realização de testes de todo o rebanho, num intervalo de 30 a 90 dias entre testes, até que se obtenha resultado negativo em todos os animais testados. Todos os animais reagentes positivos deverão ser sacrificados ou destruídos. Após essa etapa, deverá ser obtido um segundo teste de rebanho negativo com intervalo de 90 a 120 dias em relação ao primeiro e um terceiro teste de rebanho negativo com intervalo de 180 a 240 dias (do segundo). No último exame, a colheita deverá ser acompanhada pelo serviço oficial de defesa sanitária animal e os testes realizados em laboratório oficial credenciado. Quando se conseguem consecutivamente os três testes de rebanho negativos, o estabelecimento de criação estará apto a receber o certificado de livre de brucelose (BRASIL, 2006).

3 - OBJETIVOS

3.1- Objetivos Gerais

Estimar a prevalência de *Brucella sp* em vacas de leite através de teste sorológico do AAT e identificar os índices vacinais para a prevenção da mesma no município de Paraíba do Sul utilizando a amostra B19.

3.2- Objetivos específicos

O presente estudo teve por objetivos estimar a prevalência em propriedades leiteiras e identificar os fatores de risco para a brucelose bovina no município de Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro.

Fornecer informações epidemiológicas para a melhor implementação e gestão do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).

Avaliar se o quantitativo de fêmeas vacinadas com amostra B19 influenciou diretamente no controle da doença com a redução de casos positivos e diminuição de rebanhos infectados comparado a estudos anteriores, e através destas informações avaliar o andamento do PNCEBT no município.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento amostral do sorodiagnóstico com AAT

O município de Paraíba do Sul possui atualmente 350 propriedades com exploração bovina, destas, 135 com produção leiteira, sendo que algumas ainda fazem a criação mista com gado de corte (SEAPEC, 2015). As propriedades com este perfil não estão distribuídas de forma homogênea dentro dos quatro distritos em que o município é dividido.

Num primeiro estágio de seleção as propriedades foram colocadas em conjunto e sorteadas de forma aleatória, onde foi selecionado um total de 15 propriedades para amostragem. Em um segundo estágio sorteou-se um número pré-estabelecido de fêmeas que seriam examinadas por propriedades, ficando determinado que em propriedades com até 99 fêmeas acima de 24 meses seriam coletadas 10 amostras de soro sanguíneo, e em propriedades acima de 99 fêmeas com idade superior a 24 meses de idade seriam coletadas

15 amostras de soro sanguíneo, isso de acordo com a mesma metodologia aplicada no levantamento realizado no estado do Rio de Janeiro anteriormente (KLEIN-GUNNEWIEK et al. 2009), e que estas vacas preferencialmente estivessem em lactação, caracterizando sua atividade produtiva e reprodutiva. Para ser participante cada produtor assinou o termo de consentimento esclarecido conforme Anexo II.

O planejamento amostral para as unidades secundárias visou estimar um número mínimo de animais a serem examinados dentro de cada propriedade de forma a permitir a sua classificação como foco ou não foco de brucelose. Para tanto, foi utilizado o conceito de sensibilidade (capacidade que o teste diagnóstico/triagem apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos) e especificidade (capacidade que o teste diagnóstico/triagem tem de detectar os verdadeiros negativos) agregadas (DOHOO et al., 2003). Para efeito dos cálculos foram adotados os valores de 95% e 99,5%, respectivamente, para a sensibilidade e a especificidade do protocolo de testes utilizado (FLETCHER et al., 1998) e 20% para a prevalência estimada. Nesse processo o tamanho da amostra escolhido foi aquele que permitiu valores de sensibilidade e especificidade de rebanhos iguais ou superiores a 90%. Assim, nas propriedades com até 99 fêmeas com idade superior a 24 meses, foram amostrados 10 animais e nas com 100 ou mais fêmeas com idade superior a 24 meses, 15 animais. A escolha das fêmeas dentro das propriedades foi casual e sistemática.

Com este delineamento amostral, se coletou para realização de exames amostras de sangue de vacas adultas em lactação com idade superior a 24 meses de idade usando ao Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) em propriedades pré-selecionadas de forma aleatória, as quais possuem em seu perfil a exploração pecuária leiteira, sendo considerada positiva onde pelo menos um animal fosse positivo ao teste.

Para as análises foi utilizada a prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) aprovado pelo MAPA, e autorizado pelo Serviço de Sanidade Animal MAPA-SSA-RJ a aquisição para pesquisa conforme legislação vigente. A técnica de uso do teste (AAT) competiu em equilibrar os soros e o antígeno à temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$) por pelo menos 30

minutos, homogeneizando os soros antes de realização das provas. Utilizar micropipetador de 30µL, dispensando em cada área da placa de vidro com ângulo de 45°. Após agitar o antígeno, coloca-se uma gota (30µL ao lado do soro) sem misturar. Para misturar, usa-se o misturador simples ou múltiplo com movimentos circulares de modo a obter um círculo de 2 cm aproximadamente. Após, a placa é agitada com movimentos oscilatórios com frequência de 30 movimentos por minuto permitindo que a mistura soro-antígeno flua lentamente dentro de cada círculo, devendo-se repetir este procedimento por 4 minutos exatamente, levando a placa sobre caixa preta de leitura com luz indireta avaliando os resultados.

Para efeitos de comparação no estudo foram ainda utilizados os relatórios de notificação dos casos positivos de brucelose bovina emitida por médicos veterinários habilitados no MAPA durante o período de 2012 a 2015, via ficha epidemiológica mensal entregue por cada um destes.

4.2. Índices vacinais B19 e fatores de risco

Foi realizada uma avaliação de dados da vacinação contra brucelose das fêmeas com idade entre 3 e 8 meses de idade utilizando a amostra B19 através do Sistema Integrado de Defesa Agropecuária junto ao Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios (SEAPEC, 2015).

Foi feito um questionário epidemiológico em cada propriedade amostrada, além da coleta de sangue para a sorologia, elaborada para obter informações sobre o tipo de exploração e as práticas de manejo empregadas, visando levantar os fatores de risco para brucelose e controle adotado pelas propriedades amostradas.

4.3. Logística

O estudo foi planejado e executado em parceria com a orientação e a entidades envolvidas no curso: EMBRAPA Gado de Leite (CNPGL), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG-ILCT), Universidade Federal de Juiz Fora (UFJF); sendo o trabalho de campo realizado com

recursos próprios do mestrando durante os anos de 2015 e 2016, sendo fornecido pela Defesa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro veículo para deslocamento. As amostras de sangue foram coletas em frascos vacutainer com auxílio de agulhas estéreis de uso único na veia jugular. Para a obtenção de soro os tubos vacutainer foram centrifugados, e os soros armazenados em tubos tipo ependorff até o processamento das amostras a temperatura de -20°C. As amostras foram processadas em laboratório particular de médico veterinário habilitado no PNCEBT pelo MAPA no estado do Rio de Janeiro, sendo realizadas todas de uma vez com o objetivo de padronizar a interpretação dos resultados.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados sorologia com AAT

Levando em consideração a proposta do mestrado profissional que se concentra no estudo da ciência e tecnologia do leite e derivados, e sabendo que a sanidade animal é um dos pilares deste seguimento, escolhemos neste trabalho os bovinos de leite, nos quais a prevalência da brucelose nestes geralmente é maior devido às práticas de pecuária intensiva a que esses animais são submetidos como encontrado, por exemplo, por KLEIN-GUNNEWIEK et al. 2009 com prevalências em gado de corte de 6,25%, gado de leite de 14,52% e rebanhos com atividades mista de 20,56%. Outra motivação é a importância da pecuária de leite para o município de Paraíba do Sul cuja exploração é realizada na maioria das vezes por mão de obra familiar.

No Brasil, a prevalência da doença em bovinos indica que 2,49% dos soropositivos e 2,04% apresentam resultados suspeitos (LANGONI et al. 2000). Com o baixo número de notificações de animais positivos e índices vacinais insatisfatórios, ao longo dos últimos 13 anos após a implantação do PNCEBT no município, buscou-se primeiramente informações das notificações oficiais ocorridas por médicos veterinários às unidades de Defesa Sanitária através das fichas epidemiológicas mensais, e os resultados obtidos através destas fichas por médicos veterinários habilitados estão representadas na tabela 4.

Ano	Casos positivos	Propriedades foco
2012	01	01
2013	01	01
2015	01	01

Tabela 4: Casos positivos comunicados na Ficha Epidemiológica (FEPI) mensal em Paraíba do Sul entre 2012 a 2015.

Sugere-se através destes dados obtidos, que está ocorrendo uma subnotificação de casos positivos para a brucelose, comparando aos levantamentos anteriores, que por tantos anos a prevalência era de 15,72% de rebanhos infectados, estando muito abaixo do encontrado em Paraíba do Sul, podendo sugerir a intensificação da fiscalização dos médicos veterinários habilitados durante as coletas de amostras e realização dos testes nos laboratórios conforme preconiza o PNCEBT.

A escolha da unidade primária de amostragem foi aleatória para a coleta das amostras e aplicação do questionário epidemiológico, sendo realizado através do cadastro de propriedades rurais junto ao serviço de defesa agropecuária com atividade reprodutiva de bovinos. A propriedade sorteada que, por algum motivo não pôde ser visitada, foi substituída por outra, nas proximidades e com as mesmas características de produção.

As reações de aglutinação que ocorreram após, ou antes, 4 minutos foram desconsiderados, e a interpretação sendo: presença de grumos=reagente; ausência de grumos=não reagente. A propriedade foi considerada positiva onde ao menos um animal apresentou resultado positivo ao teste do AAT, animais e propriedades que apresentaram resultado suspeito ou inconclusivo foram excluídas das análises. As figuras 10-A e 10-B abaixo ilustram o resultado e procedimento da análise.



Figura 10-A

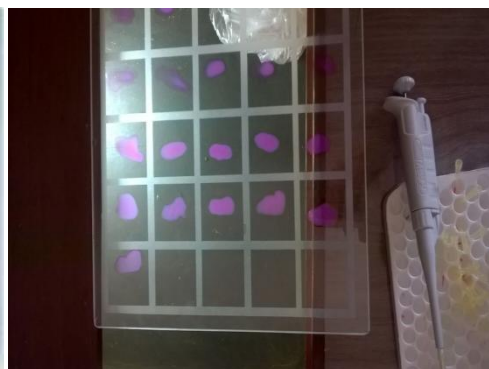


Figura 10-B

Figura 10-A- Resultado do teste AAT: Reação positiva; **Figura 10-B-** Distribuição das amostras sobre a placa para leitura.

Fonte: BRASIL, 2006; Arquivo pessoal, 2016.

No Estudo anterior realizado no estado do Rio de Janeiro no ano de 2003, no qual Paraíba do Sul foi inserida no circuito pecuário centro-oeste, os resultados foram os seguintes:

Circuito pecuário	Núcleos circuito	Propriedades testadas	Propriedades positivas	Prevalência rebanhos	Prevalência rebanho leite	Prevalência de bovinos positivos
Centro-oeste	Cordeiro, Nova Friburgo, S.M.Madalena, Resende, Barra Mansa, Pirai, Vassouras, Três Rios, Barra do Pirai.	318	50	15,72%	14,52%	2,32%

Tabela 5- Prevalência de vacas soro reagentes em 2003.

Fonte: Adaptado de KLEIN-GUNNEWIEK et al. 2009.

Naquele estudo foram utilizados os métodos de exames do AAT fazendo confirmação dos reagentes positivos com o 2-ME, e no estudo atual o diagnóstico utilizado foram as provas de AAT, por estes apresentarem em comparação com o 2-ME alta concordância, sendo proposto o uso do AAT como triagem para diagnóstico da brucelose em virtude da alta sensibilidade, especificidade, praticidade e baixo custo. Neste estudo foi estabelecido do uso somente do AAT, evitando o envio de muitas amostras a laboratórios especializados, possibilitando a realização dos testes com precisão em laboratório de médico veterinário habilitado, com rapidez e segurança, eliminando realmente aqueles animais soropositivos aos testes (MEGID et al. 2000; BRASIL, 2006).

Na tabela 6, é representado o quantitativo de fêmeas bovinas nas explorações pecuárias do município utilizadas no estudo em questão, incluindo todos os tipos de explorações e finalidades divididas por categoria de faixa etária. Foram amostradas 11,1% das propriedades com aptidão leiteira do município, sendo amostrados 0,99% de fêmeas em idade reprodutiva acima de 24 meses de idade, conforme as tabelas 5 e 6. Sendo possível com a análise e comparação dos resultados, identificar que houve uma queda na prevalência de 14,52% para 6,66% de propriedades foco, e de 2,32% para 0,59% de animais infectados. O presente estudo sugere que a introdução do PNCEBT no estado, e em particular no município de Paraíba do Sul está sendo um fator positivo quanto ao controle da brucelose, mesmo que ainda conforme o preconizado, mesmo que a meta de índices vacinais de 80% não tenha sido atingida, é possível afirmar que a doença está tendendo a queda da prevalência. Dessa forma, se aproxima a introdução do próximo passo do programa, que é a iniciação dos processos de certificação e reconhecimento de propriedades livres da brucelose através de exames sorológicos e descarte de animais positivos.

00-12F	13-24F	25-36F	+36F	Total	Total Propriedade	Propriedades exploração leiteira	Total fêmeas amostradas	Nº propriedades
3253	3354	3812	13223	23642	350	135	170	15

Tabela 6 - Total de fêmeas bovinas por faixa etária em Paraíba do Sul em 2016 participantes da sorologia.

Na tabela 7 são representados os animais amostrados de acordo com a localização no município, de forma a identificar a distribuição das amostragens mesmo que aleatórios foi homogênea sendo.

Propriedade	Localidade	Nº de fêmeas estudo	Nº fêmeas >24meses	Negativos	Positivos
Propriedade 1	Palestina	10	95	10	0
Propriedade 2	Passagem	15	174	15	0
Propriedade 3	Inema	10	23	10	0
Propriedade 4	Inema	10	12	10	0
Propriedade 5	Queima Sangue	10	80	10	0
Propriedade 6	Queima Sangue	10	66	10	0
Propriedade 7	Eng. Carvalhães	10	27	10	0
Propriedade 8	Cavaru	15	144	15	0
Propriedade 9	Conceição	10	15	10	0
Propriedade 10	Sincorá	15	260	14	1
Propriedade 11	Vieira Cortez	15	134	15	0
Propriedade 12	Barão de Angra	10	29	10	0
Propriedade 13	Limoeiro	10	35	10	0
Propriedade 14	Palestina	10	55	10	0
Propriedade 15	Barão de Angra	10	17	10	0
Total		170	1166	169	1

Tabela 7- Total de fêmeas bovinas amostradas por rebanho e positivas ao teste do AAT para brucelose em Paraíba do Sul.

Na tabela 8 são demonstrados as propriedades e animais positivos no estudo. Verifica-se a prevalência em rebanhos e animais baixou quando comparado ao estudo realizado no levantamento em 2003, que fora encontrado 15,72% de rebanhos e de 2,32% de vacas positivas, sugerindo que a introdução do PNCEBT tem colaborado com a queda da prevalência da brucelose no município.

Total de propriedades com animais positivos	Total de animais positivos	Prevalência da doença	
		Animais	Rebanhos
01	01	0,59%	6,66%

Tabela 8- Prevalência de animais e rebanhos infectados pela brucelose no município de Paraíba do Sul-RJ.

5.2. Avaliação dos índices vacinais B19

Outra análise efetuada foi o levantamento dos índices vacinais contra brucelose com amostra B19. Esta foi realizada através dos relatórios mensais das vacinações ocorridas nas propriedades com exploração pecuária de Paraíba do Sul. Estes dados são fidedignos, tanto pelo conhecimento da região quanto pelo acesso aos documentos sanitários e epidemiológicos, o que

contribuiu para a precisão das análises dos dados veterinários e zootécnicos das propriedades em questão.

O número de bezerras vacinadas identificados no período compreendido entre 2011 e 2015 usados como referência neste estudo para comparações com outros índices está representado na tabela 9.

ANO	Nº rebanhos com fêmeas em idade vacinal	Nº de rebanhos com vacinação	Fêmeas existentes em idade vacinal	Fêmeas vacinadas B19
2011	250	80	3200	567
2012	245	111	3380	3015
2013	248	119	3467	2598
2014	255	129	3387	2375
2015	241	130	3448	2529

Tabela 9- Fêmeas vacinadas em relação ao número de fêmeas existentes no período de 2011 a 2015.

É possível afirmar que das quinze propriedades do estudo selecionadas aleatoriamente, oito não realizam uma vez a cada semestre conforme legislação, ou nunca realizaram vacinação contra brucelose das fêmeas de 3 a 8 meses. As outras sete realizam vacinação com regularidade de ao menos uma vez por semestre conforme preconizado pela Resolução SEAPPA de 2008 (SEAPEC, 2015). Estes dados corroboram com os dados oriundos das planilhas vacinais gerais do município, que a cobertura vacinal atinge atualmente próximo de 50% do total de propriedades. É importante ressaltar que todas as propriedades que realizam a vacinação com frequência estão associadas ao fato de possuírem assistência veterinária permanente.

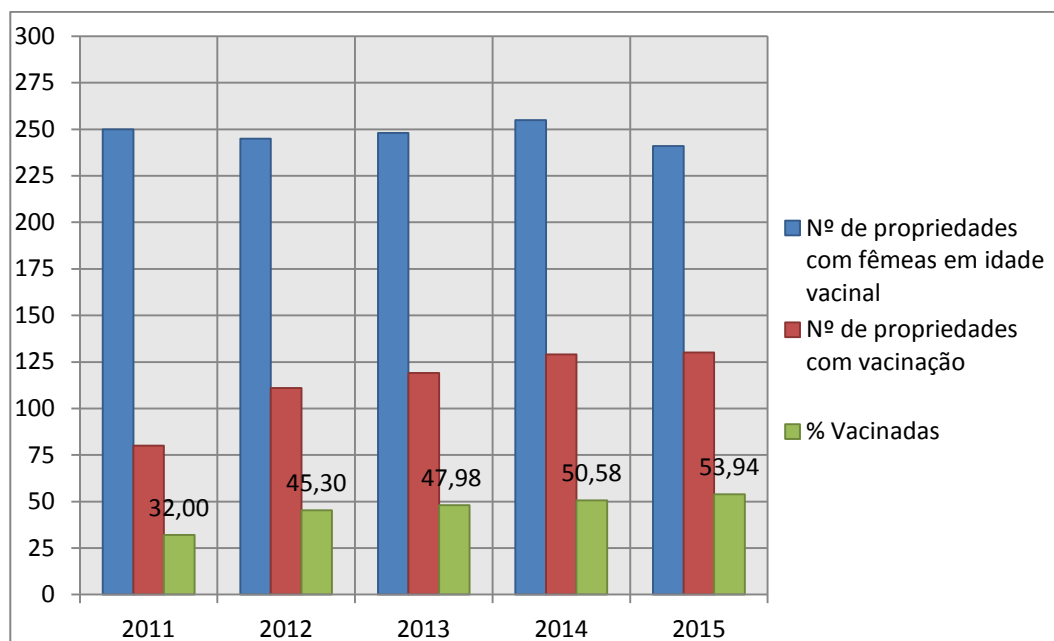


Figura 11- Porcentagem de rebanhos vacinados anualmente contra brucelose entre os anos de 2011 a 2015.

O período de análise das vacinações com amostra B19 levado em consideração se estende desde o mês de janeiro de 2011 até o mês de dezembro de 2015. Percebe-se que a cobertura vacinal tende a uma estabilização após 2012. As propriedades em questão cobertas por vacinação ao longo dos anos acabam se repetindo, e aquelas cujas vacas não foram vacinadas nada se alterou, ou seja, acaba sendo uma tendência destas não realizarem a vacinação. Isso ocorre talvez pela estratégia do programa, em que o produtor é cobrado somente durante a procura aos Núcleos de Defesa Agropecuária para emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) e quando as cooperativas e laticínios exigem a vacinação das referidas bezerras como condição para o recebimento do leite destes produtores. Desta forma talvez seja interessante ao serviço de Defesa Agropecuária o estabelecimento de metas mais ajustadas, como a fiscalização *in loco* nas propriedades inadimplentes e fazer com que estes realizem de fato a vacinação das fêmeas contra brucelose.

Reiteramos que esta é obrigatória conforme preconiza a IN 21 de 07/12/2001 do MAPA e resolução SEAPEC 43 de 22/08/2008, as quais determinam que todas as fêmeas nesta idade devam ser vacinadas com amostra B19 e o produtor deve apresentar uma vez por semestre o atestado de

vacinação assinado por médico veterinário cadastrado junto ao órgão competente. Ato contínuo determina que estabelecimentos de laticínios e cooperativas que recebam leite destes produtores suspendam a coleta daqueles que descumprirem o determinado pela resolução, e ainda o trânsito de animais devendo ser suspenso até que o produtor se regularize (SEAPEC, 2015).

Confirmamos ainda a não adesão dos criadores no município ao uso da amostra RB51, que possui características de proteção semelhantes à B19, e por ser rugosa, previne a formação de anticorpos reagentes nos testes sorológicos de rotina, não interferindo, portanto, no diagnóstico sorológico da enfermidade (POESTER, 2006; LAGE et al., 2008). Com os resultados encontrados seria interessante a sua utilização, a qual foi liberada no Brasil como princípio de vacinação estratégica de fêmeas adultas, assim como para aquelas fêmeas que não foram vacinadas com amostra B19 entre 3 e 8 meses de idade, podendo ser recomendada ainda para propriedades foco da doença para fêmeas adultas negativas aos testes de triagem (BRASIL, 2006).

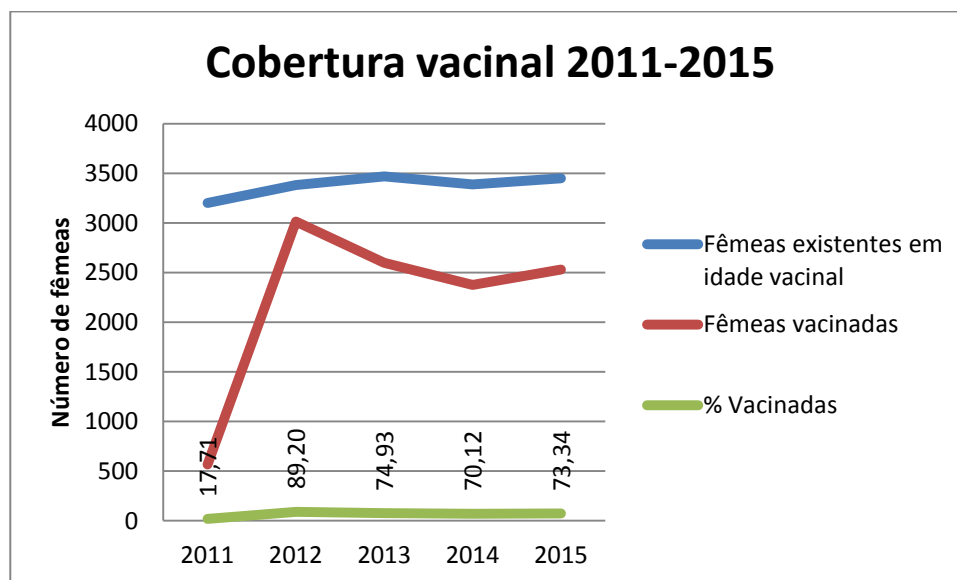


Figura 12- Porcentagem de fêmeas vacinadas entre 2011 e 2015 contra brucelose com amostra B19 na faixa etária de 3 e 8 meses.

O programa municipal de vacinação contra brucelose, implantado efetivamente a partir de 2010, no qual é oferecido pela prefeitura municipal em

parceria com a Cooperativa de Laticínios de Paraíba do Sul, o qual presta assistência veterinária gratuita para realização da vacina nas bezerras de produtores que não possuem assistência veterinária permanente. De acordo com nosso levantamento é possível observar que após sua introdução, houve uma tendência de aumento do número de fêmeas vacinadas até uma estabilização no ano de 2012. No entanto ainda é fato o grande número de rebanhos descobertos, não atingindo o que é preconizado pela legislação que seria de 80% de rebanhos cobertos e 100% de fêmeas vacinadas com idade entre 3 e 8 meses, conforme o PNCEBT, o que possibilitaria uma redução da doença a níveis considerados ideais próximos a 2% de rebanhos infectados (BRASIL, 2006).

5.3. Avaliação dos fatores de risco da brucelose

Em cada propriedade amostrada foi aplicado um questionário epidemiológico para se analisar as práticas zootécnicas e sanitárias que poderiam estar associadas aos riscos de infecção da brucelose. Com os resultados apresentados na tabela 10 é possível concluir que apenas 7/15 produtores realizam a vacinação conforme preconizado pelo PNCEBT, ou seja, uma vez por semestre, o que influenciaria na redução da prevalência. A legislação preconiza-se 80% de índices vacinais para baixar a prevalência para menos de 2% dos animais infectados. Isto em longo prazo pode comprometer o andamento do programa de erradicação com baixos índices (BRASIL, 2006).

Outro fator considerado de alto risco de acordo com KLEIN-GUNNEWIEK et al.(2009) é que a principal forma de introdução da brucelose em rebanhos livres é através da compra de animais infectados ou sem exames, e o encontrado foi que 7/15 dos produtores não se preocupa com este fato, sem exigir o exame negativo de brucelose. Outros fatores podem ainda atuar de forma independente ou em associação, como por exemplo, a frequência da compra de animais e histórico de realização de testes sorológicos de brucelose para eliminação dos positivos do rebanho. Foi constatado que nas propriedades foco sempre tem uma maior frequência de aquisição de animais em idades reprodutivas comparadas às propriedades livres, e neste levantamento conclui-se que todas as propriedades realizam a compra de

matrizes ou reprodutores, considerando que não somente a entrada destes é relevante para a introdução, mas também a falta de cuidados sanitários ao realizá-la, a qual deveria ser dada a preferência em adquirir animais de propriedades livres ou certificadas para brucelose e ainda exigir exames negativos, realização de quarentena sanitária até a repetição de um próximo exame na propriedade de destino, ou seja, uma série de fatores que podem contribuir com a entrada ou não da brucelose num rebanho sadio.

O aluguel de pastos, caminhos em comum, abortos e descarte de restos placentários e fetos de forma incorreta, atuam diretamente como agentes de contaminantes ambientais, como solo, pastagens e água contaminadas, e são fatores considerados de risco relevantes, em que é facilitada a inserção da doença em rebanhos livres, e que esta prática é encontrada pelos criadores no presente estudo, devendo-se orientá-los sobre a importância e medidas a serem adotadas.

Rebanhos bovinos com maior número de animais em idade reprodutiva são mais susceptíveis a introdução da brucelose, por dois fatores principais, como citado por PAULIN e FERREIRA NETO, (2003); e LAGE *et al.*(2005), que predominantemente ocorre uma exploração pecuária mais intensiva e uma maior taxa de reposição de animais, possibilitando a circulação com maior facilidade do patógeno. Quanto aos abortamentos, é importante ressaltar que este é um dos sinais clínicos mais importantes como citado por MARVULO (2009), sendo uma das consequências da infecção brucélica, devendo-se realizar medidas de controle como descarte adequado de restos placentários e fetos além de realização de testes de rotina para eliminação animais soropositivos, levando em consideração a suspeita clínica.

Quanto a um fator de risco considerado para infecção do ser humano, sabendo que a brucelose é uma zoonose, no presente estudo foi encontrado um alto índice do comércio informal do leite produzido, que 8/15 produzem ou vendem leite cru para produção de queijos artesanais, e 2/15 ainda vendem o leite cru direto ao consumidor, e como estabelecido pelo RIISPOA, 1952 e citado por PAULIN & FERREIRA NETO, 2003 e BRASIL, 2006, que todo leite destinado ao consumo humano deve passar por processamento industrial com

o objetivo de eliminar todas as bactérias patogênicas para o homem, o que verifica que grande volume deste não está passando por este procedimento.

Faz vacinação das fêmeas com idade entre 3 e 8 meses contra brucelose? Todas as fêmeas do rebanho estão vacinadas?	SIM=7/15
Faz exames de brucelose do rebanho? Qual a regularidade?	6/15; 4/15 1 VEZ/ANO; 2/15 2/ANO
Ao adquirir animais em idade reprodutiva (fêmeas $\geq$ 24 meses e machos $\geq$ 8 meses) Exige exames negativos de brucelose?	SIM=7/15
Possui histórico de abortos em vacas? Se sim, O que faz com restos placentários e fetos abortados?	SIM=9/15; 3 ENTERRAM
Aluga pastos para criação de outros produtores?	SIM=1/15
Possui caminhos (servidão) para animais de vizinhos?	SIM=6/15
Faz uso de IA?	SIM=7/15 NÃO=8/15
Abate animais na propriedade?	SIM=1/15
Presença de áreas alagadiças?	SIM=12/15
Possui piquetes maternidade e parição?	SIM=5/15
Possui assistência veterinária permanente?	SIM=6/15
Sistema de criação : () Intensivo () Semi-extensivo() Extensivo	I=3; SE=9; E=3
Quantidade de animais no rebanho total?	MEDIA =77,7
Aquisição de animais () vizinhos (9)outras propriedades mesmo município (4) mesmo estado (7) outro estado (6) em leiloes e/ou feiras do Rio genética	MM=9; ESTADO=4; OUTRO ESTADO=7; FEIRAS/LEILÕES=6
Para onde o leite produzido é enviado? () cooperativa () laticínio () queijo () direto ao consumidor cru	QUEIJO=8; LATCOOP=7; CRUCONS=2
Qual a média de produção diária?	MEDIA =346,6

Tabela 10-Resultados questionário dos possíveis fatores de risco para a brucelose nas propriedades participantes da sorologia.

Ocorreu desde o ano de 2009 um acentuado aumento do rebanho bovino no Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios, saindo de 63.300 a cabeças chegando a mais de 84.000 bovinos cadastrados, havendo uma queda no total de propriedades com criatórios ativos, chegando atualmente a 1040 propriedades ativas (SEAPEC, 2015), e Paraíba do Sul saindo 27.525 bovinos em 384 propriedades para 34.338 bovinos em 399 propriedades. Isso caracteriza um manejo mais intensivo dos rebanhos, o que pode contribuir com a propagação das doenças, inclusive infecciosas, em que o ciclo depende de controle mais eficaz, como por exemplo, o trânsito de bovinos destinados à reprodução.

Mesmo com esta intensificação está havendo uma diminuição de casos quando se fala de brucelose, sendo importante ressaltar que isto está relacionado possivelmente a maior conscientização de criadores e de profissionais envolvidos na atividade. Isto mostra a eficiência de projetos de educação sanitária continuada. Estes projetos ocorrem com uma boa frequência em comunidades rurais e escolas do município, devido a parcerias entre o Serviço de Defesa Agropecuária através do núcleo de Três Rios e Secretarias Municipal de Agricultura e Educação.

Os projetos de vacinação visando atender principalmente aqueles que não possuem assistência veterinária permanente ou não possuem condições de realizar o pagamento desta, e o trabalho de educação continuada e controle de trânsito de animais com destino a reprodução na região tem facilitado alcançar bons índices, tanto vacinais e de prevalência, podendo ainda sugerir a introdução da vacinação com amostra RB51, dando ênfase a propriedades foco e naqueles rebanhos com cobertura vacinal baixa que existe fêmeas que não foram vacinadas com amostra B19 na idade entre 3 e 8 meses. A partir daí se discutir amplamente o próximo passo do programa que será as certificações de propriedades livres da brucelose.

6-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação epidemiológica, realizada a partir dos casos notificados trazidos do campo pelo Serviço de Inspeção e Defesa Sanitária Animal, tem como objetivo identificar as fontes e as origens da forma como a transmissão está ocorrendo e dos grupos expostos ao risco, confirmar diagnóstico e determinar as principais características epidemiológicas. E, como proposta central, orientar medidas de controle para impedir a ocorrência de novos casos.

Com base no mapeamento e identificação dos casos confirmados de brucelose em bovinos, tem-se um facilitador das ações na fonte do problema, ou seja, nas propriedades caso, introduzindo formas e medidas de controle na criação de animais de produção de forma mais eficiente. Além da entrada da doença em rebanhos sadios via animais infectados, fatores como a ausência ou baixos índices de vacinação, o grande tamanho e alta densidade de alguns

rebanhos e a demora de realização de exames para eliminação dos animais suspeitos e infectados, propiciam a maior transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; LAGE *et al.*, 2005).

Assim, diante dos resultados, mesmo que tendendo ao controle comparado aos resultados anteriores, sugerimos a implantação de programas de educação continuada, objetivando o fortalecimento de todo o sistema de defesa agropecuária do estado e do governo federal. Com estas ações se possibilita a inserção do tema e se oportuniza aos produtores o entendimento dos riscos e importância do rebanho livre da doença, evitando prejuízos no futuro, pois a brucelose é uma realidade no Estado do Rio de Janeiro.

Através de educação sanitária em defesa agropecuária pode-se fazer chegar aos criadores e entidades afins, a informação que o controle da brucelose deve ser feito por um conjunto de ações tais como: controle de trânsito de animais com destino a reprodução principalmente, a conscientização de que animais positivos devem ser abatidos e destruídos, desinfecção de instalações e destruição de fetos e restos placentários, quarentena de animais introduzidos em rebanhos, aquisição de animais somente de propriedades certificadas livres de brucelose e exames de saúde em pessoas envolvidas, além da intensificação da vacinação e marcação das fêmeas com idade de 3 a 8 meses com amostra B19, visando baixar cada vez mais os índices de manifestação da zoonose.

Incentivar cada vez mais a introdução de programas de vacinação em massa, principalmente em municípios com índices baixos, visando atingir índices vacinais acima de 80%, conforme preconizados pelo PNCEBT. Assim, com prevalência da doença em baixa no Estado, partir para a erradicação, evitando a propagação entre animais e a contaminação dos seres humanos, já que, no município, há o hábito de consumo de leite in natura e de queijos artesanais feitos de leite cru, fato comum em outras regiões do estado e do país.

Sugerir, através dos resultados encontrados em Paraíba do Sul, o incentivo a trabalhos de investigação epidemiológica em outras regiões, já que as notificações oficiais estão muito aquém do almejado, podendo estar à doença ocorrendo e se difundindo de forma silenciosa. Ressaltamos que a

realização de projetos de pesquisa semelhantes, favorece o andamento do PNCEBT, já que o leite é um alimento imprescindível para a alimentação humana, devendo ser produzido e beneficiado sob todos os padrões e normas higiênicas, sabendo que a brucelose é uma zoonose, que leva além de prejuízos econômicos a pecuária leiteira sérios riscos para a saúde humana.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTINHO, E.A.S, **Relatório de Estágio Supervisionado**-Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa.2015. Disponível em: www.cienciadoleite.com/cienciadoleitenanutricaohumana, acessado em 12 de junho de 2016.

ALBUQUERQUE, C. **Educação Sanitária: agrotóxicos, saúde humana e meio ambiente**, MAPA-Superintendência Federal de Agricultura de Goiás, Biblioteca pública Pio Vargas, Goiás, 99 p.; 2005.

ALVES, A. J. S.; VILLAR, K. S. **Brucelose Bovina e sua situação sanitária no Brasil**. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP.São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 2, p. 12–17, 2011.

ARASHIRO, E.K.N.; TEODORO, V.A.M.; MIGUEL, E.M. **Mastite bovina: importância econômica e tecnológica**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.61, n.352, p.32-36, 2006.

BASTOS, M.S.R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Hig. Aliment.**, v. 13, n. 66/67, p. 32-36, 1999.

BEER,J.**Doenças Infecciosas em animais domésticos**,São Paulo,ROCA,1^a Ed.,1999.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)** / organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. Brasília, DF: MAPA/SDA/DSA, 2006.

BRASIL - Ministério da Agricultura. R.I.I.S.P.O.A. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, DF, 29 mar. 1952.

BRASIL - MAPA. Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011. **Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil ,Seção 1, p. 6., Brasília, 31 dez. 2011.

BURTON, H. **Ultra-High Temperature Processing of Milk and Milk Products**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1988.

CORBEL, M. J.; ELBERG S. S.; COSIVI, O. **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO Press102 p. , 2006.

CORREA, O. **Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos**. Livraria Sulina Editora. 2ª edição. p. 1-356, 1974.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H;**Veterinary epidemiologic research**. Charlottetown, Canadá: Atlantic Veterinary College, 2003. 706p.

FERREIRA, R.M.A., **Avaliação do Impacto Ambiental e a legislação Brasileira**. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v. 21, n. 202, p.5-11, jan./fev, 2000.

FONTANESI, C.D.,**Viabilidade de *Brucella abortus* durante a cura de queijo parmesão fabricado com leite experimentalmente contaminado**,65pág.,São Paulo,2012.

FORTES, E. ,2004. **Parasitologia Veterinária**.São Paulo:Icone, 4ª Ed.;2004.

GARCIA, E.G.; **Segurança e Saúde no Trabalho Rural: A Questão dos Agrotóxicos**, Ministério do Trabalho e do Emprego – Fundacentro , 182 p.;2001.

GRASSO,L.M.P.S. **O combate à brucelose bovina**.2000.112 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000.

IBGE. **Senso agropecuário 2006**. Rio de Janeiro 2006. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>. Acesso em:15 de dezembro 2015.

IBGE.Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- **Produção da Pecuária Municipal 2014**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

KLEIN-GUNNEWIEK,M.F.C. **Epidemiological situation of bovine brucellosis in the States of Rio de Janeiro,Brazil**.31 fl.Faculdade de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal,São Paulo,2010.

JARDIM G.C., PIRES P.P., MATHIAS L.A. & RIBEIRO O.C. & KUCHEMBUCK M.R.G. **Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus***. Pesquisa Veterinária Brasileira 26(3):177-182,2006.

LANGONI, H.; ICHIHARA, S.M.; SILVA, A.V.; PARDO, R.B.; TONIN, F.B.; MENDONCA, L.J.P.; MACHADO, J.A.D. **Isolation of *Brucella spp* from milk of brucellosis positive cows in Sao Paulo and Minas Gerais states**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., Sdo Paulo, v. 37, n. 6,p. 444-448, 2000.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. **Brucelose ovina no Rio Grande do Sul**.Pesquisa Veterinária Brasileira, v.16, n.2/3, p.75-79, 1996.

MARVULO, M.F.V. **Situação da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul**. 2009,77f.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,Universidade de São Paulo,São Paulo, 2009.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.;MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, AJ. **Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina**. Braz,J. vet. Res. Anim.Sci., São Paulo, v. 37, n. 5, p. 395-399, 2000.

MOLNÁR E., MOLNÁR L., DIAS H.L.T., SOUZA J.S. & VALE W.G. **Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos**. Revista Bras. Med. Vet. 22(3):117-121; 2000.

MOREIRA, J. C., et al. **Avaliação Integrada do Impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo** - disponível em: www.scielo.br.php-acessado às 9:30 h em 05/05/2013; 2002.

MUBARACK,H.M.; DOSS,A.; DHANABALAN,R.;BALACHANDER,S. **Microbial quality of raw milk samples collected from different villages of Coimbatore District,Tamilnadu, South India//Indian Journal of Science and Technology Vol. 3 No. 1,2010**.

NAMIDURU, M.; GUNGOR, K.; DIKENSO, Y. O.; BAYDAR, I.; EKINCI, E.; DAROOGLAN, I.; BEKIR, N. A. **Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients**. International Journal of Clinical Practice, v. 51, p. 20-24, 2003.

NIELSEN K., GALL D., KELLY W., VIGLIOCCO A., HENNING D., GARCIA M. **Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis**. Nepean, Ontario: Animal Disease Research Institute, OIE Reference Laboratory of Brucellosis, 1996.

OLIVEIRA S.C., GIAMBARTOLOMEI G.H., CASSATARO J. **Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis**. Expert Rev. Vaccines. 19:1291-1305; 2011.

OTA, E.T.S; **Detecção de *Brucella abortus* em produtos lácteos produzidos em Santa Catarina pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, 67 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Departamento da Fiscalização. **Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal: Manual de procedimentos: Estudo soroepidemiológico da brucelose bovina e bubalina**, Curitiba, 21p. 2001.

PAULA, C.L; MIOMNI, M.S. R; APPOLINÁRIO, C.M; KATAYAMA, E.R; ALLENDORF, S.D; MEGID, J; **Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR)**; Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.82 1-5, 2015.

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

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

RIO DE JANEIRO. **CIDE (Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro). Divisão político-administrativa do Estado do Rio de Janeiro**. <http://www.cide.rj.gov.br>; acesso em 06 de abril de 2015.

ROUQUAYROL, M.Z.; **Epidemiologia e Saúde**, 6ª Ed., 728 p., 2003.

SANTIAGO, Tilden, **O ambiente é responsabilidade de toda a sociedade.** Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v.21, n.202, jan./fev, p.1-2, 2000.

SANTOS G.T., **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, p.206-217, 2002.

SCHOLZ, H.C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I. et al. **Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. v.58, p.375-382, 2008.

SGARBIERI, V.C. **Revisão: propriedades estruturais e físicoquímicas das proteínas do leite.** Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v.8, n.1, p.43-56, 2005.

SEAPEC- Secretaria de Agricultura e Pecuária do Estado do Rio de Janeiro, **Arquivos de dados de campo-Núcleo de Defesa Agropecuária de Três Rios**, 2015.

SMITH, H.; WILLIAMS, A.E.; PEARCE, J.H.; KEPPIE, J. **Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion.** Nature, v. 193, p. 47-49, 1962.

ANEXO I

Questionário epidemiológico para avaliar o tipo de exploração e o manejo sanitário e zootécnico que podem estar associados ao risco de infecção pela brucelose

- 1) Faz vacinação das fêmeas com idade entre 3 e 8 meses contra brucelose?
Todas as fêmeas do rebanho estão vacinadas?
- 2) Faz exames de brucelose do rebanho? Qual a regularidade?
- 3) Ao adquirir animais em idade reprodutiva (fêmeas $\geq$ a 24 meses e machos $\geq$ a 8 meses) exige exames negativos de brucelose?
- 4) possui histórico de abortos em vacas? Se sim, o que faz com restos placentários e fetos abortados?
- 5) Aluga pastos para criação de outros produtores?
- 6) Possui caminhos (servidão) para animais de vizinhos?
- 7) Faz uso de IA?
- 8) Abate animais na propriedade?
- 9) Presença de áreas alagadiças?
- 10) Possui piquetes maternidade e parição?
- 11) Possui assistência veterinária permanente?
- 12) Sistema de criação : () intensivo () semi-extensivo
() extensivo
- 13) Quantidade de animais no rebanho total?
- 14) Aquisição de animais () vizinhos () outras propriedades mesmo município
() mesmo estado () outro estado () em leilões e/ou feiras do Rio genética
- 15) Para onde o leite produzido é enviado? () cooperativa () laticínio ()
queijo () direto ao consumidor cru
- 16) Qual a média de produção diária?

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: Levantamento da prevalência da *Brucella abortus* em propriedades leiteiras de Paraíba do Sul-RJ

Prezado produtor,

Estamos convidando você a participar de um projeto de pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em parceria com a Embrapa Gado de Leite e o Instituto de Laticínio Cândido Tostes (ILCT). Os resultados obtidos contribuirão para o conhecimento da incidência da Brucelose (*Brucella abortus*) em vacas de leite no município de Paraíba do Sul, facilitando o direcionamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação Brucelose no município, e poder garantir a oferta de leite e subprodutos livre da patologia ao consumidor, direcionando o processo de erradicação da doença no município.

A sua participação nesta pesquisa é livre e voluntária, tendo como garantia de que será mantido o anonimato das propriedades, do produtor e animais examinados, e que caso não queira mais participar da pesquisa poderá sair a qualquer momento com prévia comunicação. Ressaltamos ainda que as informações colhidas durante as entrevistas com os produtores, serão apenas de interesse para pesquisa, e não para divulgação de dados pessoais e particulares do produtor e propriedade, e serão utilizadas sem que estes sejam identificados. Todas as declarações serão usadas somente para fins desse estudo e sua divulgação e transcrição estarão dentro do contexto da investigação.

Comprometo-me também, a dar um retorno quanto aos resultados obtidos, de forma que os possa utilizar em prol da sanidade do seu rebanho a saúde de pessoas envolvidas nas propriedades, visando a sanidade dos animais e o fortalecimento da bovinocultura leiteira no município. Estarão garantidos o sigilo, privacidade, anonimato e ausência de qualquer tipo de punição para as pessoas que participarem da pesquisa e também para aqueles se recusarem a participar da pesquisa. Em caso de quaisquer dúvidas encontro-me no endereço e telefone abaixo.

Assinatura do Pesquisador/Entrevistador

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**Marciel Assis de Oliveira.**

Médico Veterinário

Estrada Quirino Francisco Pinheiro, 2130, Inema - Paraíba do Sul. Tel: (24)99917-0591

marciel.assis@uol.com.br

Prof. Virgílio Carvalho dos Anjos, D.Sc.

Professor do Departamento de Física - Laboratório de Espectroscopia de Materiais

Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Campus Universitário-Bairro São Pedro

virgilio.anjos@gmail.com

Eu, _____, após ter obtido esclarecimento da pesquisa, por meio de leitura do Termo de Consentimento, estou de acordo em participar da referida pesquisa. Entendo que tenho a liberdade de aceitar ou não desta pesquisa, ou ainda, sem qualquer prejuízo para mim ou minha propriedade rural.

Telefone de contato _____.

Local _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante