

INVESTIGAÇÃO DA BRUCELOSE EM EQUÍDEOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICO EXPORTADOR

Maria Eduarda Chiaradia Furquim¹, Mariana Assunção Souza², Larissa Fernandes Magalhães³, Tais Meziara Wilson¹, Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro⁴

RESUMO

A brucelose é uma das enfermidades responsáveis por acometer os equídeos, sendo potencialmente zoonótica e ocasionada por bactérias Gram-negativas. Uma vez infectados estes animais tornam-se uma fonte de infecção importante, visto seu grande uso em diversas atividades realizadas pelo homem, como por exemplo, na atividade agropecuária. Com isso, este estudo teve como objetivo verificar a existência de brucelose nos equídeos abatidos em frigorífico exportador através dos métodos diagnósticos preconizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT, 2001). Para isso foram coletadas 107 amostras de soro sanguíneo e após a realização do teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) 43 animais foram detectados positivos, sendo que posteriormente, 5 animais foram confirmados reagentes pelo teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME).

Palavras-chave: *Brucella* spp. Cavalos. Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Com oito milhões de cabeças, o Brasil possui atualmente o maior rebanho de equídeos da América Latina e o terceiro mundial, sendo o oitavo maior exportador de carne desta espécie. A região Sudeste concentra a maior parte da população de equinos do país, cuja utilização varia entre atividades de lazer, esporte e terapia, sendo majoritariamente empregada nas atividades agropecuárias,

principalmente para o manejo de rebanhos bovinos (BRASIL, 2012).

A brucelose é uma das enfermidades responsáveis por atingir a espécie equina e caracteriza-se por uma doença infecciosa potencialmente zoonótica e de evolução crônica (ACHA e SZYFRES, 2001), causada por bactérias gram-negativas do gênero *Brucella* (ALMEIDA et al., 2007).

A transmissão destes microrganismos para a espécie equina não é bem esclarecida, porém acredita-se que a infecção ocorra através do contato próximo que estes animais possuem com outras espécies animais, principalmente bovinos, bubalinos e suínos, já que *Brucella abortus* atinge primariamente estes animais, seguidos pela *Brucella suis* (ACHA e SZYFRES, 2003).

Apesar de não haverem relatos de casos quanto à transmissão da *Brucella abortus* de equinos para os bovinos, existe um grande risco de infecção para os humanos devido à grande concentração de bactérias liberadas por fistulas supuradas (CAVALLERO et al., 2002).

Os sinais clínicos característicos da brucelose equina são genericamente denominados de “Mal da Cernelha ou “Abscesso de Cernelha” (RIBEIRO et al., 2003). Tais lesões são descritas como inflamações purulentas nas bursas, ligamentos, tendões, e articulações, principalmente na região da cernelha ou na espinha da escápula, com ou sem fistulas (VASCONCELLOS et al., 1987; PAULIN, 2003).

O diagnóstico da brucelose é geralmente realizado através da combinação de diferentes métodos, uma vez que ainda não existe nenhum método diagnóstico definitivo (POESTER et al., 2010).

¹Bolsistas PIBIC/CNPq

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – FAMEV/UFU

³Bolsista PET Medicina Veterinária FAMEV/UFU

⁴Professor adjunto do curso de Medicina Veterinária – FAMEV/UFU

O diagnóstico laboratorial de *Brucella* spp. pode ser direto, pela identificação do agente (bacteriológico) ou indireto, pela detecção de anticorpos contra estes microorganismos no soro dos animais (sorológico) (BRASIL, 2006).

No ano de 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), implementou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), visando reduzir a prevalência da brucelose no país, bem como seus impactos negativos (BRASIL, 2006).

O PNCEBT prioriza como métodos indiretos de diagnóstico o teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), que é posteriormente confirmado pelo teste 2-Mercaptoetanol (CARRAZA et al., 2010).

Mesmo com a grande disponibilidade de testes sorológicos para o diagnóstico desta doença, diferentes autores têm alertado a ocorrência de reações inespecíficas e a falta de padronização na interpretação destes métodos para a espécie equina (LANGENEGGER e SZECHY, 1961; RIBEIRO et al., 2003).

Os estudos traçando o perfil epidemiológico desta doença em equídeos no território nacional são escassos, o que impossibilita estudos sistemáticos sobre os impactos desta infecção. Ademais, nos raros trabalhos que abordam esta enfermidade, a metodologia empregada não está de acordo com a recomendada pelo PNCEBT, dificultando a comparação dos resultados em outros estudos (ARAUJO et al.; 2009).

Segundo inquérito sorológico realizado por Vianna et al. (1981), onde foram utilizados 810 soros de equinos obtidos no estado de Minas Gerais, apenas 0,24% dos animais eram reagentes no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).

Já em estudo realizado no estado de São Paulo, entre os anos de 1977 e 1987, para o reconhecimento de antígenos contra *Brucella abortus* em um número de 103 amostras de sangue equino, 12,62% destas eram positivas no teste de AAT (FEITOSA et al., 1991).

Durante os anos de 2004 e 2005, Araujo et al. (2009) colheram 477

amostras de sangue de equídeos provenientes de 24 cidades da Zona da Mata de Minas Gerais. Após a realização do teste do AAT, 8,18% dos soros apresentaram-se positivos.

Almeida et al., (2007) examinaram 875 amostras de soro de equinos abatidos na região Sul e Sudeste pelo método do AAT e constataram 15 (2%) dos animais eram reagentes.

Segundo Carraza et al., (2010) em investigação soropidemiológica no município de Uberlândia-MG, onde foram analisadas 120 amostras de equinos de tração de área urbana, nenhum destes animais foram reagentes.

Portanto, visto a importância dos equídeos na cadeia epidemiológica da brucelose, este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência desta doença em equídeos abatidos em frigorífico exportador.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho foram obtidas 107 amostras de soro sanguíneo de equinos e muars abatidos no Frigorífico Prosperidad S/A (SIF - 1803) localizado no município de Araguari, estado de Minas Gerais, no período de dezembro 2011 a fevereiro 2012. Após os procedimentos de rotina de abate estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) as amostras foram colhidas e armazenadas em tubo sem anticoagulante para realização dos exames de diagnóstico oficial. Durante o processo de abate foram identificados equinos que apresentaram manifestações clínicas sugestivas de brucelose, como a bursite cervical ou nugal, fistuladas ou não, assim como equinos escolhidos aleatoriamente sem estes sinais.

As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 3.000 rpm e as amostras de soro acondicionadas em tubos tipo eppendorfs estéreis, e mantidos a -20°C até o momento da realização dos exames.

Os testes sorológicos escolhidos para a análise das amostras foram os preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, criado em 2001 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), já que para a espécie equina não existem métodos padronizados para o diagnóstico de brucelose. Com isso, realizou-se a triagem pelo exame do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), sendo este posteriormente confirmado pelo teste do 2-Mercaptoetanol, conforme descrito pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação e Tuberculose (BRASIL, 2006).

RESULTADOS

Dentre as 107 amostras obtidas, 73 eram machos e 34 fêmeas. Estes animais sem raça definida eram provenientes dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Bahia e Mato Grosso do Sul.

O teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) identificou 43 amostras positivas e 54 negativas. Já no teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol, 5 animais reagiram positivamente, enquanto 28 foram negativos e 10 inconclusivos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos resultados nos testes de AAT e 2-ME das amostras de soro sanguíneo colhidas de equinos abatidos em Araguari – MG, no período de dezembro de 2011 a fevereiro de 2012.

AAT \ 2-ME	Negativo	Positivo	Inconclusivo	Total
Negativo	64 (60%)	-	-	64 (60%)
Positivo	28 (26%)	5 (5%)	10 (9%)	43 (40%)
Inconclusivo	-	-	-	-
Total	92 (86%)	5 (5%)	10 (9%)	107 (100%)

Durante o exame *post-mortem*, 13 animais foram identificados como portadores de abscessos de cernelha ou nugal, sinais estes que podem indicar uma infecção por *Brucella* spp. Contudo, somente um destes 13 animais foi positivo no teste AAT e quando o teste 2-ME foi realizado o resultado foi negativo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, a partir dos testes diagnósticos, chamaram atenção para o grande número de animais positivos (40%) para o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Destes, somente 5% dos animais reagiram positivamente no teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (2-ME).

Tais resultados encontrados diferem dos encontrados por Vianna et al. (1981), Feitosa et al. (1991), Araujo et al. (2009), Almeida et al. (2007) e Carraza et

al. (2010) que obtiveram índices menores que 13% ou nenhum reagente.

Segundo Bundle et al. (1987), todas as espécies de *Brucella*, com exceção da *Brucella canis* e *Brucella ovis*, possuem em sua membrana externa um lipopolissacarídeo (LPS) que contém um O-polissacarídeo imunodominante (OPS).

A exposição dos animais a brucelas patogênicas leva a produção de imunoglobulinas (Ig), caracterizado pelo aparecimento de quatro isotipos: IgM, IgG1, IgG2 e IgA (NIELSEN, 2004). A resposta por IgM surge poucos dias após a infecção e aumenta rapidamente, alcançando um valor máximo por volta da segunda semana. Posteriormente, esses valores caem, porém mantém-se em níveis detectáveis (NIELSEN et al., 2001).

Teoricamente, devido à produção precoce de IgM, a melhor maneira de indicar a exposição a *Brucella* spp. seria a mensuração deste isotipo. Entretanto,

vários microorganismos também possuem antígenos com epítomos similares ao OPS da brucela e a principal resposta a estes antígenos é pelo IgM (CORBEL, 1985).

Quando um animal é exposto a uma bactéria Gram-negativa com o LPS similar ao da *Brucella abortus*, os anticorpos formados podem ser detectados em testes sorológicos (MUÑOZ et al., 2005). Portanto, resultados falso-positivos podem ser ocasionados por uma reação cruzada com epítomos imunodominantes presentes no LPS da *Brucella abortus*, que podem ser encontrados em diversas bactérias Gram-negativas (AL DAHOUK et al., 2006).

Segundo Naves et al. (2012), em estudo realizado em bovinos recém-vacinados para leptospirose para avaliar a interferência desta em testes diagnósticos para brucelose, as reações cruzadas observadas no teste do Antígeno Acidificado Tamponado sugerem que há a possibilidade da *Brucella abortus* e bactérias do gênero *Leptospira* spp. possuam um LPS parecido, levando o antígeno da *Brucella* a reconhecer o anticorpo produzido pela *Leptospira* spp.

De acordo com diversos autores, bactérias como *Yersenia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp., *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* O157:H7 podem reagir em testes sorológicos para Brucelose (AL DAHOUK et al., 2006; GODFROID et al., 2002; KITTELBERGER et al., 1998; MOLNÁR et al., 1997; NIELSEN et al., 2004).

CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, quarenta e três equinos foram reagentes no teste do antígeno acidificado tamponado para brucelose, sendo que cinco também reagiram no teste confirmatório que se constitui de soroaglutinação lenta e 2-mercaptoetanol. Tais resultados demonstram que existem equinos que podem ser potenciais fontes de infecção para os outros animais, ou até mesmo o ser humano.

ABSTRACT

Brucellosis is one of the diseases that affect horses, potentially zoonotic and caused by Gram-negative bacteria. Once

infected these animals become an important source of infection, since men use them in several activities such as farming. Therefore, the purpose of this study was verify the existence of brucellosis in horses slaughtered in a exporting slaughterhouse using the diagnosis methods selected by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply in the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (2001). So the blood serum of 107 animals was assessed by the rose Bengal antigen test and 43 of them were detected positive. Subsequently, 5 of them were confirmed positive in the 2-Mercaptoethanol test.

Keywords: *Brucella* spp. Horse. Diagnostic.

REFERENCIAS

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

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 28-56.

AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H.; BOGUMIL, C.; NEUBAUER, H. Immuno-proteomic characterization of *Brucella abortus* 119-3 preparations used for serodiagnosis os *Brucella* infections. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, p. 34-47, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175905003960>. Acesso em: 04 de outubro de 2012.

ALMEIDA, M. R.; MORAES, M. P.; PATARROYO, J. H.; VIDIGAL, P. M.; BOREM, A. **Biotecnologia e Saúde Animal**, Viçosa MG, p. 288, 2007.

ARAÚJO, R. R.; PENA, L. J.; PENA, D. A.; DIAS, F. M.; MORAES, M. P. Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella* spp. em

equídeos da região da zona da mata do estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p.681-684, out./dez., 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico: Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT**, Brasília: MAPA/DAS/DAS, 2006, 184p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Equídeos. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>, 2012. Acessado em: 06 de agosto de 2012.

BUNDLE, D. R.; CHERWONOGRODZKY, J.; CARROF, M.; PERRY, M. B. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. **Ann Institut Pauster Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 92-98. 1987.

CARRAZA, L. G.; JUNQUEIRA, Y. F.; CARRAZA, T. G.; OLIVEIRA, P. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Soroepidemiologia da brucelose em equinos de tração em áreas urbanas no município de Uberlândia- MG. **Horizonte Científico**, Uberlândia, v. 4, n. 2, 2010.

CAVALLÉRO, J. C. M.; POESTER, F. P.; MATHIAS, L. A. Enfermidades da reprodução: Brucelose. In: LEMOS, R. A. A. (org.), BARROS, N. (org.), BRUM, K. B. (org.). **Enfermidades de interesse econômico em bovinos de corte – perguntas e respostas**. Editora UFMS. Campo Grande. 239 – 252. 2002.

CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. **Veterinary Bulletin**, v. 55, p.927–942. 1985.

FEITOSA, M. H.; BITTAR, C. R.; GOMES, S. P. Brucelose: levantamento sorológico no Estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. **Veterinária e Zootecnia**, v.3, p. 9-15, 1991.

GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V.; WALRAVENS, K;

LETESSON, J. J.; TIBOR, A.; MCMILLAN, A.; SPENCER, S.; SANNA, M.; BAKKE, R. D.; POUILLOT, R.; GARIN-BASTUJI, B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 461–477, 2002.

KITTELBERGER, R.; BUNDESEN, P. G.; CLOECKAERT, A.; GREISER-WILKE, I.; LETESSON, J. J. Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 45–57, 1998.

LANGENEGGER, J.; SZECHY, A.M. Brucelose dos equídeos domésticos: isolamento de *Brucella abortus* de bursites de cernelha no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, v. 4, p. 49-63, 1961.

MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; TURY, E.; SOUSA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, p. 157–162, 1997.

MUÑOZ, P. M.; MARÍN, C. M.; MONREAL, D.; GONZALÉZ, D.; GARIN-BASTUJI, B.; DÍAZ, R.; MAINAR-JAIME, R. C.; MORIYÓN, I.; BLASCO, J. M. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 1, 41-151, 2005. Disponível em: <http://intl-cvi.asm.org/content/12/1/141.full.pdf+html>. Acesso em: 04 de outubro de 2012.

NAVES, J. H. F. F.; REZENDE, L. M.; RAMOS, G. C.; SOARES, P. M.; TAVARES, T. C. F.; FRANÇA, A. M. S.; NEVES, S. M. N.; SILVA, N. A. M.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p.283-287, 2012.

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

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 163–170. 2001.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, p. 239-249, 2003.

POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L. E.; YU, W. L. Diagnosis of Brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 46-60, 2010.

RIBEIRO, M. G.; NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P.; Anti-*Brucella abortus* agglutinins in serum and secretion of fistulous withers in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, p. 99-101, 2003.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v. 1, p. 25-36, 1987.

VIANA, F. C.; REIS, R.; SANTOS, W. L. M. Inquérito sorológico para brucelose equina em Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 33, p. 431-435, 1981.