

ISOLAMENTO DE *BRUCELLA* SP. DO LEITE DE VACAS SOROPOSITIVAS PARA BRUCELOSE NO MUNICÍPIO DE VILA MARIA, RS

DASSO, M.G.¹ ; GALIMBERTI, V.² ; DA SILVEIRA, A.M.³ ; COPPOLA, M.M.⁴ ; BRAGA, A.C.⁵ GERKE, V.E.T.⁶
GROFF, A.C.M.⁷ ; VIDAL, C.E.S.⁸

INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial que causa grandes perdas econômicas nas criações animais, bem como risco considerável à saúde pública (Acha *et al.*, 2001). As principais manifestações nos animais, como abortos, nascimentos prematuros, esterilidade e baixa produção de leite, contribuem para uma considerável queda na produção de alimentos (Poester *et al.*, 2002; Brasil, 2005). Em bovinos leiteiros, a brucelose assume grande importância em função das inúmeras perdas sanitárias e econômicas causadas, assim como pela possibilidade de transmissão pela ingestão do leite contaminado (Schein *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de soro

Foram analisadas 90 (noventa) amostras de soro de vacas provenientes de uma propriedade de gado leiteiro (tambo de leite) localizada no município de Vila Maria, região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Estes animais encontravam-se em diferentes estágios de lactação e não eram vacinados contra brucelose. As amostras não receberam nenhum tipo de tratamento (conservantes) e foram mantidas sob refrigeração até a execução dos testes.

Amostras de leite

Foram coletadas 9 (nove) amostras de leite daqueles animais que apresentaram resultado positivo no teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (2-ME). Alguns animais que foram positivos no teste confirmatório não estavam em lactação ou não foi possível a coleta das amostras de leite.

Diagnóstico Imunológico

Foram utilizados os testes oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). O Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi o teste de rotina (triagem) adotado e o Teste do Mercaptoetanol (2-ME) foi o teste confirmatório empregado. O Teste do Anel em Leite (TAL) foi utilizado para verificar a presença de anticorpos anti-*Brucella* nas amostras de leite dos animais confirmados positivos nos testes sorológicos.

1 Médico Veterinário Pesquisador - FEPAGRO – IPVDF - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul/RS, 92990-000 brucelose@ipvdf.rs.gov.br *

2 Acadêmica de Biologia, UNILASALLE– Canoas/RS; Estagiária IPVDF

3 Química Pesquisadora - FEPAGRO - IPVDF

4 Médico Veterinário Pesquisador - FEPAGRO – IPVDF

5 Médico Veterinário Pesquisador - FEPAGRO – IPVDF

6 Médico Veterinário PNCEBT – Nova Araçá/RS

7 Médica Veterinária – Coordenadora do PNCEBT/RS – SAA

8 Médico Veterinário – Coordenador do PNCEBT/RS - MAPA

Diagnóstico Bacteriológico

Foi realizado o isolamento bacteriológico de todas as 9 (nove) amostras de leite coletadas. De cada amostra foram semeados a camada de gordura e o sedimento, após centrifugação, em placas contendo Meio de Farrel e ágar triptose. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo entre 5 e 10% CO₂ e em O₂ livre, permanecendo até 30 dias (Alton *et al.*, 1988).

Caracterização Bioquímica dos Isolados

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 90 (noventa) amostras de soro analisadas, 28 (vinte e oito) foram identificadas positivas no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) (31,1%), sendo submetidas ao Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME). Destas 28 amostras testadas, 20 (vinte) foram positivas (71,4%) confirmando os resultados obtidos no teste de rotina.

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos nas 20 amostras positivas no teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol, e também no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), com o Teste do Anel em leite (TAL) e com o isolamento bacteriológico. Vila Maria, 2008.

Amostras	AAT	2-ME	TAL	Isolamento
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	+
3.	+	+	+	+
4.	+	+	+	+
5.	+	+	+	+
6.	+	+	+	+
7.	+	+	+	+
8.	+	+	+	-
9.	+	+	+	-
10.	+	+	X	X
11.	+	+	X	X
12.	+	+	X	X
13.	+	+	X	X
14.	+	+	X	X
15.	+	+	X	X
16.	+	+	X	X
17.	+	+	X	X
18.	+	+	X	X
19.	+	+	X	X
20.	+	+	X	X

+ resultado positivo; - resultado negativo; X não realizado.

As 9 (nove) amostras de leite analisadas reagiram positivamente no TAL (100%) e em 7 (sete) destas amostras foram isoladas *Brucella* sp. (77,8%).

Os 7 (sete) isolados foram obtidos somente a partir da camada de gordura superior das amostras de leite. Apesar do isolamento bacteriológico não apresentar uma sensibilidade muito alta, discordando um pouco dos resultados obtidos neste trabalho, um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção (Salgado *et al.*, 1995).

O meio utilizado para o crescimento de *Brucella* foi o de Farrel, que se caracteriza por ser um meio seletivo, onde são adicionados vários antimicrobianos. Não houve crescimento de *Brucella* quando as amostras foram incubadas em oxigênio livre, ocorrendo crescimento somente em atmosfera contendo 5 a 10% de CO₂, o que sugere a identificação de *Brucella abortus* em todos os isolados. Visando a caracterização dos isolados, foi verificado o crescimento do agente na presença dos corantes tionina (20 µg/mL) e fucsina (20 µg/mL) básica, e também do antimicrobiano penicilina (5 UI/mL). Todos os 7 isolados apresentaram crescimento na presença de fucsina e penicilina, mas foram inibidos na presença de tionina, o que sugere a identificação do biovar 1 ou do biovar 4 de *Brucella abortus* em todas as amostras.

CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual Técnico do

Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT, Brasília, 2005. 190 p.

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

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

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

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

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

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