

COMPARAÇÃO DA PROVA SOROLÓGICA DO TESTE DE ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM TOUROS COM A AVALIAÇÃO DO EXAME ANDROLÓGICO E IMPACTO DA INFECÇÃO FRENTE AO AGRONEGÓCIO

Edval Batista dos Santos¹, Geraldo de Nardi Junior²

¹Acadêmico do Curso de Tecnologia em Agronegócio, Faculdade de Tecnologia, Botucatu, SP, Brasil.

²Prof. Ass. Dr. Disciplina Produção Animal, Faculdade de Tecnologia, Botucatu, SP, Brasil, e-mail: gedenardjr@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é reconhecida como doença infecto-contagiosa causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*), caracterizada por manifestações clínicas da esfera reprodutiva e severos prejuízos aos produtores (ACHA e SZYFRES, 2003). Na América Latina, as perdas econômicas devido a brucelose são da ordem de 600 milhões de dólares/ano. No Brasil, os prejuízos com a brucelose em bovinos foram estimados em 100 milhões dólares/ano (Folha de São Paulo, 2000).

O produto interno bruto (PIB) do estado de São Paulo é estimado em cerca de 727 bilhões de reais, equivalente a 33,9% do PIB do Brasil. A atividade agropecuária constitui 1,5% desse total, correspondente a 18,7% do PIB agropecuário do país (São Paulo, 2005). O rebanho bovino brasileiro é estimado em 200 milhões de animais (IBGE, 2006). Neste cenário, faz-se importante considerar que o aparecimento de problemas sanitários, como a brucelose, impacta de forma acentuada a unidade produtiva, particularmente a cadeia agroindustrial, restringindo mercados e determinando prejuízos na produção (DIAS et al., 2009).

Os sinais clínicos da brucelose estão relacionados principalmente à esfera reprodutiva. Nas vacas, a doença se caracteriza por abortamentos, metrite e retenção de placenta (VASCONCELLOS et al., 1987). Nos touros a patogenicidade do agente está associada principalmente à

infecção das glândulas acessórias e aos testículos (HAFEZ, 1995), manifestada principalmente por vesiculite e, secundariamente, por quadros de orquite e epididimite (RADOSTITS et al., 2007), levando frequentemente os animais infectados a sub e/ou infertilidade (NICOLETTI, 1986).

A fertilidade é, inquestionavelmente, uma das mais importantes características de produção a ser considerada, tanto nos sistemas de produção de carne quanto nos de leite. Economicamente, o mérito reprodutivo é cinco vezes mais rentável para o produtor de bezerros do que o desempenho no crescimento, e dez vezes mais significativo do que a qualidade do produto. Esses aspectos ilustram os reflexos da atividade reprodutiva nos criatórios de bovinos (BARBOSA et al., 2005).

Ao se considerar o touro isoladamente nos plantéis, conclui-se que a importância da fertilidade do macho é muito maior do que a de qualquer fêmea individualmente, visto que o touro pode se acasalar com número muito maior de fêmeas, na monta natural ou quando se considera a inseminação artificial (BARBOSA et al., 2005).

As principais causas de baixa fertilidade ou de infertilidade em touros criados no Brasil - independentemente da constituição genética - são degeneração testicular, maturidade sexual retardada, hipoplasia testicular, espermiogênese imperfeita e imaturidade sexual. Todos esses distúrbios ocorrem como consequência

de fatores ligados ao ambiente desfavorável, procedimentos de manejo incorretos, fatores de ordem genética e, principalmente, de origem infecciosa (HAFEZ, 1995; BARBOSA et al., 2005). Pelo exame andrológico completo podem ser detectadas alterações do desenvolvimento do sistema genital, anomalias regressivas, patologias progressivas e alterações inflamatórias, oriundas ou não de doenças infecto-contagiosas nos diversos órgãos, bem como distúrbios na libido e na habilidade de cópula. Essas alterações levam tanto à incapacidade de fertilização como de monta, em graus variáveis, determinando quadros de subfertilidade e/ou de infertilidade nos machos dos plantéis (BARBOSA et al., 2005).

O isolamento de *B. abortus* dos fetos abortados, da placenta, do leite e do sêmen é considerado o método mais fidedigno no diagnóstico individual da brucelose (SANDOVAL et al., 1979). No entanto, a dificuldade de isolamento do microrganismo e a restrição de diagnóstico dos rebanhos dificultam o uso do diagnóstico microbiológico como método de controle massal da doença (VASCONCELLOS et al., 1987). Neste contexto, devido às limitações dos procedimentos laboratoriais que se apóiam no cultivo do gênero *Brucella*, o diagnóstico da brucelose bovina tem sido fundamentado na investigação de Ig anti-*B. abortus* no soro sanguíneo, leite e sêmen (CASAS OLASCOAGA, 1976; NIELSEN e DUNCAN, 1990).

Inquérito sorológico realizado pelo PNCEBT – MAPA, no Brasil, em 2009 em 15 estados mostrou prevalência variável nas diferentes regiões da Federação, tão baixa quanto 0,06% de animais infectados no estado de Santa Catarina (SIKUSAWA et al., 2009), como taxas elevadas de 12% no estado de Mato Grosso do Sul (CHATE, et al., 2009). Particularmente no estado de São Paulo, foi constatada prevalência de 3,8% de animais infectados, e a compra de reprodutores e propriedades com mais de 87 cabeças foram os principais fatores de

risco relacionados à doença (DIAS et al., 2009).

A localização preferencial da bactéria nas glândulas acessórias e testículos nos machos bovinos pode induzir, curiosamente, a presença de baixos títulos ou mesmo a ausência de títulos séricos de Ig em touros infectados, dificultando o diagnóstico da brucelose nos machos bovinos com base em métodos sorológicos convencionais (RADOSTITS et al., 2007). Casas Olascoaga (1976) afirmou que machos bovinos acometidos por *B. abortus* podem reagir à infecção mostrando baixos títulos de Ig séricas. Vasconcellos et al. (1987), no Brasil, e Radostits et al. (2007), nos EUA, referiram a possibilidade de ausência de aglutininas séricas anti-*Brucella abortus* em provas convencionais de soroaglutinação em touros da espécie bovina infectados, apesar da presença do microrganismo no sêmen e glândulas acessórias. Na vigência de baixos títulos de aglutininas séricas em touros nas provas sorológicas de triagem, recomenda-se a confirmação sorodiagnóstica em testes como 2-ME ou FC. Em touros com baixos títulos ou ausência de aglutininas séricas anti-*B. abortus*, o diagnóstico pode ser confirmado pela técnica de sêmen plasma aglutinação (SPA), que se fundamenta na detecção de IgG e IgA no sêmen, decorrentes da produção local de Ig frente à infecção pelo microrganismo (CASAS OLASCOAGA, 1976; SUTHERLAND, 1980; VASCONCELLOS et al., 1987; GRASSO e CARDOSO, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Em anos recentes, tem-se mostrado promissor o uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), no diagnóstico de fragmentos específicos do DNA bacteriano de *B. abortus* em espécimes de sêmen bovino (MIYASHIRO, 2004).

Considerando o grande rebanho bovino no Brasil, o potencial zoonótico da brucelose, o impacto negativo da doença nos plantéis, os prejuízos ao agronegócio e a dificuldade do

diagnóstico da doença em touros, o presente estudo pretende comparar o teste de antígeno acidificado tamponado no diagnóstico da brucelose em touros com a avaliação do exame andrológico e o impacto da infecção frente ao agronegócio em touros criados na região centro-oeste do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 191 touros em idade reprodutiva, de diferentes raças ou mestiços, sem sinais aparentes de orquite ou inflamação das glândulas acessórias, provenientes da região centro-oeste do estado de São Paulo.

As amostras de soro sanguíneo dos animais foram colhidas assepticamente por venopunção jugular. Após a separação do soro, as amostras foram aliquotadas e congeladas (-20°C). As amostras de sêmen foram colhidas pelo método de eletroejaculação (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PALMER, 2005) e analisadas imediatamente quanto à viabilidade espermática.

O diagnóstico sorológico foi realizado utilizando a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) corado com rosa bengala, conforme as recomendações do PNCEBT do MAPA (BRASIL, 2009), no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 191 amostras de soro colhidas foram testadas pela prova do AAT (BRASIL, 2009) e após a obtenção do sêmen por eletroejaculação, todos os animais foram submetidos ao exame andrológico (HAFEZ, 1995).

Nenhum dos animais apresentou reação na prova do AAT. No entanto ao exame andrológico, 10 animais (5,2%) foram considerados inaptos para serviços reprodutivos embora esses animais não tenham apresentado soroconexão na prova

sorológica. Diferentes autores afirmam que machos bovinos acometidos por *B. abortus*, podem reagir à infecção com baixos títulos de Ig séricas, (CASAS OLASCOAGA, 1976), ou mesmo não reagirem em provas de soroaglutinação (VASCONCELLOS *et al.*, 1987; RADOSTITS *et al.*, 2000) e que podem ocorrer alterações andrológicas devido a infecção (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Casas Olascoaga (1976) afirmou que machos bovinos acometidos por *B. abortus* podem reagir à infecção mostrando baixos títulos de Ig séricas. Vasconcellos *et al.* (1987), no Brasil, e Radostits *et al.* (2007), nos EUA, referiram a possibilidade de ausência de aglutininas séricas anti-*Brucella abortus* em provas convencionais de soroaglutinação em touros da espécie bovina infectados, apesar da presença do microrganismo no sêmen e glândulas acessórias. Na vigência de baixos títulos de aglutininas séricas em touros nas provas sorológicas de triagem, recomenda-se a confirmação sorodiagnóstica em testes como 2-ME ou FC. Em touros com baixos títulos ou ausência de aglutininas séricas anti-*B. abortus*, o diagnóstico pode ser confirmado pela técnica de sêmen plasma aglutinação (SPA), que se fundamenta na detecção de IgG e IgA no sêmen, decorrentes da produção local de Ig frente à infecção pelo microrganismo (CASAS OLASCOAGA, 1976; SUTHERLAND, 1980; VASCONCELLOS *et al.*, 1987; GRASSO e CARDOSO, 1998; RADOSTITS *et al.*, 2007), PCR e cultivo microbiológico de sêmen (MIYASHIRO, 2004, QUINN *et al.*, 2005).

CONCLUSÕES

Cabe ao profissional do agronegócio instruir os criadores, tratadores, e trabalhadores rurais às medidas de controle e profilaxia desta doença para que tais problemas sejam sanados. Medidas que possam levar, inclusive, os criatórios a certificação de propriedades monitoradas e livres de

brucelose, agregando valor ao rebanho bovino e seus produtos (carne, leite e derivados).

Com relação à saúde pública a brucelose é considerada doença ocupacional em humanos. O advento da pasteurização do leite representou redução significativa no impacto da doença em saúde pública. Porém, nos países emergentes (em desenvolvimento), a brucelose ainda permanece como doença preocupante. As infecções pelo gênero *Brucella* em humanos possuem forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com contato ou exposição aos animais como os profissionais do agronegócio.

Portanto propiciar aos tecnólogos do agronegócio pesquisas na área da doença salienta a preocupação com a infecção em rebanhos e sua transmissão aos seres humanos.

O diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos no Brasil foi modificado pela Instrução normativa nº2, de 10 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, deflagrado pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT (BRASIL, 2009). O PNCEBT preconiza o sorodiagnóstico da brucelose bovino e bubalina pelas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e fixação de complemento (FC). O AAT é recomendado como método de rotina (triagem), enquanto o 2-ME e FC como provas confirmatórias, embora somente a FC seja preconizada para o comércio e trânsito internacional de animais (BRASIL, 2009). Com a realização do diagnóstico e a adoção de medidas de controle e profilaxia prescritas pelo PNCEBT o tecnólogo poderá orientar o criatório a conseguir certificação de monitoramento e livres da doença.

Em tempo, o diagnóstico desta enfermidade é de vital importância à produção animal e aos profissionais do agronegócio. Integrar os estudantes no diagnóstico e demonstrar sua

importância é forma de contribuir para o controle e erradicação da doença nos rebanhos, evitar o contágio do ser humano, agregar valor no produto da produção animal e valorizar o criatório brasileiro mundialmente.

REFERÊNCIAS

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.

BARBOSA, R.T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. Circular Técnica. São Carlos, SP, p.1-13, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2009.

CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. Zoonosis, v.18, p.107-141, 1976.

CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. v.61, supl.1, p.46-55, 2009.

DIAS, R.A.; Caracterização espacial da brucelose bovina no estado de São Paulo. 2004. 111p. Tese (Doutorado em epidemiologia experimental aplicada as zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LOBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. v.61, supl.1, p.118-125, 2009.

FOLHA DE SÃO PAULO. Jornal a folha de São Paulo. Disponível em <http://www.folhaonline.com.br>. Acesso em 02 de setembro de 2000.

GRASSO, L.M.P.S.; CARDOSO, M.V. Brucelose bovina. Biológico, v.60, p.71-79, 1998.

HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. São Paulo: Manole Ltda. p.3-20, 1995.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reprodução animal. 8.ed. São Paulo, 2004, 583p.

IBGE. Censo agropecuário 2006. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>> Acessado em: 14 fev. 2011.

MIYASHIRO, S. Presença de DNA de Brucella abortus em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa vacinal (B19) ou de campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR).2004. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. Animal brucellosis. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.

NICOLETTI, P. Brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: MORROW, D.A. Current therapy in theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.271-274.

PALMER, C.W. Welfare aspects of therioogenology: investigating alternatives to eletroejaculation of bulls. Theriogenology, v.64, p.469-479, 2005.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe, p.261-267, 2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 2156p.

SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M.; GIORGI, W.; AMARAL, L.B.S.; MAZANTI, M.T. Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo. Biológico, v.45, p.209-212, 1979.

SÃO PAULO. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. Produto interno bruto do Estado de São Paulo. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/pib/index.php>> Acessado em: 14 fev. 2011.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. v.61, supl.1, p.103-108, 2009.

SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. Vet. Bull., v.50, p.359-368, 1980.

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CÔRTEZ, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal. Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. USP, v.11, p.25-36, 1987.