

FRANCISCO CECÍLIO VIANA

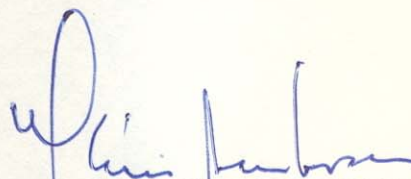
BRUCELOSE SUÍNA: PREVALÊNCIA EM SUÍNOS ABATIDOS EM MATADOUROS DE BELO HORIZONTE E COMPARAÇÃO DA SORO-AGLUTINAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS SOROLÓGICOS.

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
1975

Tese aprovada em 02.05.1975

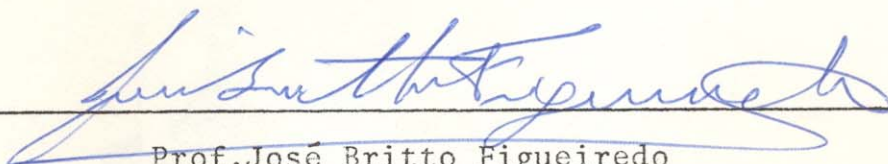
BANCA EXAMINADORA



Prof. Mário Barbosa



Prof. Ronaldo Reis



Prof. José Britto Figueiredo

O autor agradece àqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG:

MÁRIO BARBOSA: ORIENTADOR - Prof. Titular
RONALDO REIS: CONSELHEIRO - Prof. Adjunto
JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO - Prof. Titular
ÉLVIO CARLOS MOREIRA - Prof. Assistente

Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva:

Antônio Benjamin de Paula
Luiz André de Lima
Marília Conceição Nogueira
Olívia Moreira
Rima Namy Abuhid
Sebastião Fernandes de Oliveira

Departamento Nacional de Tecnologia e Inspeção de Produtos Agropecuários-Ministério da Agricultura-Belo Horizonte.

Grupo Executivo de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DEMA MG.

O presente trabalho teve apoio financeiro das seguintes Instituições:

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva - Belo Horizonte - Minas Gerais

Conselho de Pesquisas da Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - Minas Gerais.

1. Introdução -----	1
2. Revisão de Literatura -----	5
3. Material e Método -----	9
4. Resultados -----	15
5. Discussão -----	24
6. Conclusões -----	29
7. Resumo -----	32
8. Summary -----	34
9. Referências Bibliográficas -----	36

A brucelose é doença responsável por vultosos prejuízos à pecuária nacional, além de constituir importante zoonose.

Assim, dados fornecidos pelo "Center for Disease Control" Atlanta; USDA (BUSCH & PARKER, 1972), referentes ao período 1965-1969, revelam que, em 1085 casos de brucelose humana, os suínos foram incriminados, como a mais provável fonte de infecção com 402 casos (37%)

Em suínos provoca aborto, esterilidade, artrites, paraplegias, abscessos e ainda nascimento de animais fracos. Ao lado desses sintomas, a doença pode evoluir para a cronicidade, sob a forma de infecção inaparente (CALDAS, 1963).

A suinocultura constitui uma atividade de grande importância para o Brasil, que se encontra colocado entre os maiores produtores mundiais.

Em 1970, o Brasil contava com rebanho suíno da ordem de 31.501.693 cabeças, sendo que o Estado de Minas Gerais ocupava a 3ª colocação com 3.291.527 cabeças. (ANUÁRIO ESTATÍSTICO, 1972).

Sendo a brucelose suína fator limitante em algumas criações, justifica-se conhecer sua real prevalência no país.

DADOS SOBRE PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE SUÍNA NO BRASIL

No Brasil, existem poucos trabalhos sobre frequência da brucelose suína.

NEIVA (1934), em 644 suínos abatidos no Estado de São Paulo, encontrou 44,04% de brucelose (título \bar{x} 1:100). VALLE (1953) examinando 510 suínos, no Estado de Minas Gerais, encontrou 3,9% de positividade. Dados referentes a sete Estados do Brasil, em 1973, mostram que de 10.452 suínos examinados, apenas 347 foram positivos para brucelose (3,3%), sendo que para o Estado de Minas Gerais, de 1.511 suínos, apenas 33 (2,18%) foram positivos. (BRASIL, 1973). Outros trabalhos referem-se à descrição de casos clínicos e à frequência da doença, a partir de amostras pequenas (NEIVA, 1944; CUNHA & BIFONE, 1950; HIPÓLITO & cols., 1951; VALLE, 1953; HIPÓLITO & cols. 1958 e BRASIL, 1973).

Levantamentos sorológicos da brucelose suína em alguns países revelam prevalência de 0,29% -10,3%, mostrando ainda divergências na escolha da nomenclatura e do título positivo, conforme os dados constantes da Tabela 1.

TABELA 1

Levantamento sorológico da brucelose suína em alguns países, título, número de animais testados, porcentagem de positividade e fonte consultada. 1954/1970.

País	Título à soro-aglutinação clássica.	Número de suínos testados	Porcentagem de positividade	Fonte Consultada
Argentina	1:100	1.525	2,10	FRANCO & CARRILLO (1970)
Canadá	1:100	21.275	0,29	MALKIN & cols. (1968)
França	30 UI*	5.122	3,40	PILET & cols. (1963)
Guatemala	1:100	6.564	8,52	GÁLVEZ (1969)
Índia	40 UI*	410	3,17	SONI & PATHAK (1969)
Itália	1:40	484	10,33	BARSINI & FOCACCI (1954)
Uruguai	1:50	400	4,25	CAFFARENA Y BACHERS & cols. (1967)

*UI = Unidades Internacionais.

Para o diagnóstico da brucelose sob a forma crônica ou aguda, empregam-se provas sorológicas de aglutinação em tubo (método lento) ou em placa (método rápido) (ALTON & JONES, 1969). Essas provas, embora utilizadas em muitos países que desenvolvem programas de controle ou erradicação da brucelose, apresentam como principal desvantagem a ocorrência de aglutinações inespecíficas, que são de várias naturezas e concorrem para redução da sensibilidade dos métodos clássicos de soro-aglutinação para diagnóstico da brucelose (HOERLEIN, 1953; ROSE & ROEPKE, 1957; ANDERSON & cols., 1964 e AKKERMANS & HILL, 1972).

Vários métodos sorológicos têm sido propostos, objetivando-se diferenciar globulinas específicas de inespecíficas, destacando-se entre eles os seguintes:

- a) Teste de Coombs.
- b) Teste de inativação pelo calor.
- c) Teste de fixação de complemento.
- d) Teste do antígeno acidificado em placa.
- e) Teste do cartão (card test).
- f) Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)
- g) Teste do rivanol
- h) Teste de ultracentrifugação
- i) Teste de imunofluorescência (método indireto).

Os objetivos da presente pesquisa são:

1. Conhecer a prevalência da brucelose em suínos do Estado de Minas Gerais, abatidos em matadouros de Belo Horizonte.
2. Comparar a eficiência dos testes relacionados, visando diferenciar reações específicas de inespecíficas na brucelose suína.

- a) Teste de soro-aglutinação em tubo
- b) Teste de Coombs
- c) Teste do 2-ME
- d) Teste do cartão
- e) Teste de imunofluorescência (método indireto)

2. REVISÃO DA LITERATURA

Reações inespecíficas, em baixos títulos, à soro-aglutinação clássica contra brucelose foram observadas em suínos sadios. (KERNKAMP & ROEPKE, 1948 e LEHNERT, 1959).

Assim, testes complementares, considerados altamente específicos, têm sido propostos para o diagnóstico da brucelose suína. (HAJDU, 1963; DEYOE, 1967 e LADWIG, 1968).

2.1. ANTÍGENO ACIDIFICADO

ROSE & ROEPKE (1957) pesquisando aglutininas contra Brucella, demonstraram que as reações eram inalteradas ou moderadamente afetadas quando empregava-se antígeno com pH em torno de 4,0 pelo método rápido. Baseado nesse mesmo princípio, foi desenvolvido o teste do cartão (card test), com o antígeno contendo 8% de células, corado pelo rosa de Bengala, tamponado e com pH 3,65 (DEYOE, 1967). De acordo ainda com esse autor, os testes do cartão, de inativação pelo calor e do antígeno acidificado em placa são mais indicados que os métodos rápido e lento de soro-aglutinação, para diagnóstico da brucelose suína e o teste do cartão, pela sua maior simplicidade de execução, deve ser o preferido.

LADWIG (1968) afirmou que o teste do cartão, aplicado ao diagnóstico da brucelose suína, poderia eliminar reações inespecíficas.

2.2. IMUNOFLUORESCÊNCIA (método indireto)

MOODY & cols. (1961) e BIEGELEISEN & cols. (1962), empregaram o método indireto de imunofluorescência para o diagnóstico da brucelose humana, enquanto GENTILE (1965) e SIMINTZIS & THIVOLET (1965) o empregaram para o diagnóstico da brucelose bovina.

Para FRIBOURG-BLANC (1970), o método indireto de imunofluorescência permite utilizar imune-soros de títulos elevados e muito diluídos, conferindo, assim, maior especificidade à reação e a sensibilidade dessa prova é muito grande, sendo raras reações duvidosas.

SIMINTZIS (1972), trabalhando com 988 soros de suínos, encontrou 100% de concordância entre os métodos de imunofluorescência indireta e fixação de complemento, enquanto a soro-aglutinação em tubo discordou de ambos em 3,7% dos casos.

2.3. MERCAPTOETANOL

KENYON & cols. (1961) trabalhando com lactosoro sugeriram a aplicação do 2-ME a 0,01 M, para diferenciar aglutininas 12 S de aglutininas específicas contra brucelose bovina.

ANDERSON & cols. (1964) verificaram a concordância de títulos entre os testes de fixação de complemento e as provas de anel do leite (ring-test) e soro-aglutinação lenta, quando aglutininas contra Brucella, resistentes ao 2-ME estavam presentes no soro e leite de bovinos.

GARCIA CARRILLO & cols. (1971) empregaram os métodos do 2-ME, soro-aglutinação rápida e lenta, rivanol, teste do cartão e Coombs em 26 suínos infectados com Brucella suis.

GLAWISCHNIG & CORTES (1972), trabalhando com soros de bovinos, verificaram que o teste do 2-ME é útil para o diagnóstico da brucelose em soros que apresentam reações inespecíficas.

2.4. TESTE DE COOMBS

COOMBS & cols. (1945), através do emprego de antiglobulina, evidenciaram a presença de anticorpos bloqueadores contra o fator Rh em soros humanos.

HAJDU (1963) descreveu modificação da técnica de Coombs, verificando alta especificidade e fidelidade da prova, quando empregada para o diagnóstico da brucelose de aproximadamente 80.000 bovinos. A mesma técnica, quando aplicada para o diagnóstico da brucelose em suínos, apresentou também, bons resultados.

2.5. TÍTULO SIGNIFICATIVO DE INFECÇÃO BRUCÉLICA

Em trabalhos de levantamento da frequência da brucelose suína, a maioria dos autores considera o título 1:100 como significativo. (MALKIN & cols. 1968; GÁLVEZ, 1969 e FRANCO & CARRILLO, 1970).

O Comitê de expertos em brucelose considera que o título \geq 1:100 é indicativo de infecção brucélica em suínos. Recomenda, na prática, considerar como negativos títulos de 1:50 ou inferiores, a não ser que existam no rebanho animais com títulos \geq 1:100 (FAO/OMS, 1971).

A legislação brasileira sobre brucelose animal, considera como suspeito o suíno que apresentar título igual a 1:25 e positivo quando apresentar título \geq 1:50 (BRASIL, 1958).

PREVALÊNCIA DA BRUCELOSE SUÍNA EM MINAS GERAIS

São poucos os trabalhos sobre levantamento da brucelose suína em Minas Gerais. VALLE (1953) encontrou 3,9% de prevalência em 510 suínos, enquanto o Ministério da Agricultura informou que, em 1973, encontrou 2,18% de reagentes em 1.511 suínos examinados. (BRASIL, 1973)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SOROS

Foram colhidas 629 amostras do sangue de suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte, provenientes de 21 municípios do Estado de Minas Gerais. A colheita era feita no momento da sangria, em frascos de 650 x 450 mm, 120 ml, previamente esterilizados. O sangue assim obtido era encaminhado ao laboratório dentro de 1-2 horas, centrifugado a 1.200 x G e o soro obtido era colocado em frascos de vidro esterilizados tipo penicilina, de 10 ml, identificados e estocados a -20°C até o momento do uso.

3.2. ANTÍGENOS

Para o teste de soroaglutinação em tubo, foi usado antígeno gentilmente cedido pelo Centro Panamericano de Zoonoses *

Para o teste do cartão, usou-se antígeno fornecido pela Divisão de Saúde Animal do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América **

* Série 24

** Brucellosis Card Test - Kit nº 304 - Part. 183 - Antígeno Série 189. HYNSON WESTCOTT & DUNNING - Baltimore, MD21201 - USA.

3.3. MÉTODOS SOROLÓGICOS

3.3.1. SOROAGLUTINAÇÃO EM TUBO (Método lento)

Foi empregado o método decimal, de acordo com técnica recomendada por UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - NATIONAL ANIMAL DISEASES LABORATORY (sem data).

Os soros que apresentaram 200 UI foram diluídos (1:16) para estabelecimento do título final (aglutinação 50%). Examinaram-se 629 soros.

3.3.2. TESTE DE COOMBS

3.3.2.1. PREPARO DA ANTIGAMAGLOBULINA SUÍNA

A partir de um "pool" de soros de cinco suínos normais fracionou-se a gama-globulina com solução neutra saturada de sulfato de amônio. A antigamaglobulina foi obtida segundo técnica recomendada por GOLDMAN (1968), do seguinte modo.

a) Três coelhos adultos foram inoculados, via subcutânea, com 5 mg de gamaglobulina e igual volume de adjuvante completo de Freund, com intervalo de 2 semanas para as três inoculações iniciais. Inoculações semanais foram realizadas até que fosse obtido título satisfatório, o que ocorreu na quinta semana.

A imunidade dos animais inoculados foi comprovada pela reação de Arthus, que se mostrou positiva, após seis horas de realizada e pela imunodifusão segundo técnica de OUCHTERLONY (1953), que revelou positividade de 1:1000. Para execução de teste a antigamaglobulina, após titulada segundo técnica de PENNEC (1966), foi usada a 1:160.

3.3.2.2. REALIZAÇÃO DO TESTE DE COOMBS

Este teste foi conduzido de acordo com modificação feita por HAJDU (1963). As quantidades de salina e soro foram ajustadas para se obterem diluições finais a partir de 1:25 ,

para permitir padronização de leitura com relação aos demais testes realizados.

A técnica consiste em:

- a) Colocar 2,3 ml de salina normal no primeiro tubo de hemólise (12 x 75 mm) e 0,5 ml nos demais. Adicionar 0,2 ml de soro a ser testado, misturar e aquecer a 70°C por 10 minutos.
- b) Descartar 1,5 ml da mistura do primeiro tubo. Transferir, a seguir, 0,5 ml do primeiro para o segundo tubo, e, após homogeneizar, transferir 0,5 ml para o terceiro e, assim sucessivamente, descartando-se 0,5 ml do último tubo.
- c) Colocar 0,5 ml do antígeno padrão do método lento, previamente diluído a 1:100 em salina normal e incubar a 37°C por duas horas.
- d) Colocar 1,5 ml de salina normal e homogeneizar
- e) Centrifugar a 3.000 r.p.m. (2.200 x G) por 20 minutos, descartar o sobrenadante e colocar 2,0 ml de salina normal.
- f) Repetir os itens d e e três vezes. Esta lavagem com salina é importante para remover todos os traços de soro.
- g) Após a última centrifugação, o depósito é resuspenso em 1 ml de antigamaglobulina bovina, previamente preparada.
- h) Incubar a 37°C por 17-20 horas e fazer leitura como no teste normal de tubo.

Foram examinados 62 soros de diferentes títulos (Tabela 2). O título final era aquele que correspondia a uma aglutinação 50%(++).

3.3.3. TESTE DO 2-MERCAPTOETANOL*

Foi conduzido segundo método decimal, de acordo com a técnica recomendada por UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - NATIONAL ANIMAL DISEASES LABORATORY (sem data). Examinaram-se 62 soros (Tabela 2).

3.3.4. TESTE DO CARTÃO

Foi empregada a técnica descrita por LADWIG (1968), com auxílio de equipamento especial** para agitação da mistura soro-antígeno. A reação era considerada positiva quando havia formação de grumos após 4 minutos. Foram examinados 629 soros.

3.3.5. TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (Método indireto)

3.3.5.1. ANTIGAMAGLOBULINA SUÍNA

Foi usada a mesma antigamaglobulina do teste de Coombs.

3.3.5.2. CONJUGADO

A antigamaglobulina suína foi conjugada com isotiocianato de fluoresceína (1:50 mg)^{***}, conforme técnica de CORSTVET & SADLER (1964).

* H.S. CH₂OH - PM 7813 BDH biochemicals.

** Tetracon Autocard - Tetracon Associated, Norman, Oklahoma, 73069 - USA.

*** BDH - Lot 1402790

O conjugado apresentou título de 1:5 e, após distribuído em pequenos volumes, foi estocado a -40°C , até o momento do uso.

3.3.5.3. EXECUÇÃO DO TESTE

Após diluições múltiplas do soro, a partir de 1:25 procedia-se à realização do teste de acordo com FRIBOURG-BLANC (1970). Os esfregaços foram preparados com Brucella abortus (amostra B19). Considerava-se como título final a diluição em que a Brucella estava individualizada e fluorescente. Como controle foram usados soros normais de equino e bovino e esfregaços preparados com Escherichia coli e Staphylococcus aureus. Foram examinados, em duplicata, 62 soros de suínos (Tabela 2).

TABELA 2

Número de soros de suínos examinados pelos testes de Coombs, 2-mercaptoetanol e de imunofluorescência, de acordo com o título apresentado à soro-aglutinação em tubo.

Número de soros	Título à soro-aglutinação em tubo
15	25 UI
18	50 UI
15	100 UI
3	200 UI
1	400 UI
10	Não reagentes
T O T A L: 62	

Esta amostragem foi obtida dos 257 soros inicialmente examinados, pela soro-aglutinação em tubo.

Os resultados estão registrados nas Tabelas 3 a 8.

Na Tabela 3 é mostrado o comportamento de cinco testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose suína. Alguns soros apresentaram, ao 2-ME, fenômeno de floculação, sendo necessário repetições dos mesmos para se conseguir leitura correta. Esse fenômeno foi observado em soros que não se apresentavam muito límpidos, mesmo após centrifugados. Os controles usados para o teste de imunofluorescência apresentaram resultados negativos.

Na Tabela 4 são comparados os resultados do teste do cartão e da aglutinação em tubo nos 629 soros de suínos.

Verifica-se que a partir do título 1:100 passa a existir boa concordância entre os dois testes.

Os títulos encontrados à soro-aglutinação de 629 suínos examinados são apresentados na Tabela 5. Os dados dessa tabela revelam ainda que 86 (13,7%) dos suínos possuem títulos $\bar{>}$ 1:100.

Na Tabela 6 está registrada a frequência de cada título encontrado à soro-aglutinação em tubo entre 237 suínos reagentes. Desse total 154 (65,0%) possuíam títulos $\bar{<}$ 1:50, enquanto que títulos $\bar{>}$ 1:400 foram mais raros (2,9%).

Os dados da Tabela 7 referem-se a frequência da brucelose suína em 21 municípios do Estado de Minas Gerais através de dois métodos de diagnóstico. O teste da soro-aglutinação em tubo clas-

sificou 13,2% dos suínos (título \bar{x} 1:100) como positivos, enquanto que o teste do cartão classificou 17,3%.

A Tabela 8 mostra a frequência da brucelose suína, de acordo com o sexo em 69 animais examinados, através da soro-aglutinação em tubo e teste do cartão. Novamente o último teste revelou maior número de positivos.

TABELA 3

Comparação de alguns testes sorológicos para diagnóstico da brucelose em suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte. 1973/1974

Itens	Número do soro	Soro-aglutinação em tubo	2-mercaptoetanol	Coombs	Imunofluorescência	Teste do cartão
01	20	1:25	-	-	-	-
02	25	1:25	-	-	-	-
03	32	1:25	-	1:100	-	-
04	44	1:25	-	-	-	-
05	45	1:25	-	-	-	-
06	132	1:25	-	-	-	-
07	144	1:25	-	-	-	-
08	186	1:25	-	-	1:50	-
09	192	1:25	-	-	-	-
10	200	1:25	-	-	-	-
11	202	1:25	-	-	-	-
12	217	1:25	-	-	-	-
13	229	1:25	-	-	-	-
14	250	1:25	-	-	-	-
15	255	1:25	-	-	-	-
16	10	1:50	1:25	1:50	1:100	+
17	17	1:50	1:50	1:100	1:100	+
18	19	1:50	1:50	1:50	1:50	+
19	22	1:50	-	1:50	1:200	+
20	31	1:50	-	1:50	1:50	+
21	48	1:50	1:50	1:100	1:200	+
22	57	1:50	-	1:50	1:25	+
23	63	1:50	-	-	-	+
24	65	1:50	1:50	1:50	1:50	+
25	89	1:50	-	1:50	-	+
26	93	1:50	1:25	1:100	-	+

Itens	Número do soro	Soro-aglutinação em tubo	2-mercaptoetanol	Coombs	Imunofluorescência	Teste do cartão
27	102	1:50	-	1:100	-	+
28	149	1:50	-	1:25	-	-
29	182	1:50	1:50	1:200	1:100	+
30	194	1:50	-	-	-	-
31	195	1:50	-	-	-	-
32	204	1:50	-	-	-	-
33	257	1:50	-	-	-	-
34	5	1:100	1:50	1:100	1:50	+
35	9	1:100	1:100	1:800	1:200	+
36	21	1:100	1:50	1:200	1:200	+
37	29	1:100	1:50	1:200	1:200	+
38	34	1:100	1:100	1:100	1:200	+
39	36	1:100	1:50	1:400	1:200	+
40	49	1:100	1:50	1:400	1:200	+
41	54	1:100	1:100	1:400	1:400	+
42	62	1:100	-	1:1.600	1:400	+
43	88	1:100	1:50	1:200	1:200	+
44	91	1:100	1:100	1:100	1:800	+
45	92	1:100	1:100	1:50	1:100	+
46	96	1:100	1:100	1:200	1:100	+
47	104	1:100	1:100	1:800	1:200	+
48	109	1:100	1:100	1:1.600	1:200	+
49	27	1:200	1:200	1:200	1:200	+
50	33	1:200	1:200	1:400	1:400	+
51	106	1:200	1:200	1:1.600	1:800	+
52	98	1:400	1:400	1:800	1:200	+
53	50	-	-	-	-	-
54	51	--	-	-	-	-

Itens	Número do soro	Soro-aglutinação em tubo	2-mercaptoetanol	Coombs	Imunofluorescência	Teste do cartão
55	52	-	-	-	-	-
56	53	-	-	-	-	-
57	55	-	-	-	-	-
58	56	-	-	-	-	-
59	58	-	-	-	-	-
60	59	-	-	-	-	-
61	60	-	-	-	-	-
62	111	-	-	-	-	-

TABELA 4

Resultados do teste do cartão em relação aos diferentes títulos da prova de soro-aglutinação em tubo em 629 suínos do Estado de Minas Gerais - 1973/1974.

Título à soro-aglutinação em tubo	Número de Suínos	Teste do Cartão			
		Positivo	%	Negativo	%
1:25	86	3	3,5	83	96,5
1:50	68	26	38,2	42	61,8
1:100	51	49	96,1	2	3,9
1:200	25	24	96,0	1	4,0
1:400	5	5	100,0	0	0,0
1:800	1	1	100,0	0	0,0
1:1600	1	1	100,0	0	0,0
Não reagentes	392	0	0,0	392	100,0
Total	629	109	17,3	520	82,7

TABELA 5

Resultados da soro-aglutinação em tubo para diagnóstico da brucelose em 629 suínos do Estado de Minas Gerais. 1973/1974

Título à soro aglutinação em tubo	Número de Suínos	%
1:25	86	13,70
1:50	68	10,80
1:100	51	8,10
1:200	25	4,00
1:400	5	0,80
1:800	1	0,15
1:1600	1	0,15
Não reagentes	392	62,30
Total	629	100,00

TABELA 6

Frequência de títulos à soro-aglutinação em tubo para brucelose em 237 suínos reagentes - 1973/1974.

Título à soro aglutinação em tubo	Número de Suínos	%	Frequência acumulada.	%
1:25	86	36,53	86	36,53
1:50	68	28,7	154	65,0
1:100	51	21,5	205	86,0
1:200	25	10,5	230	97,0
1:400	5	2,1	235	99,1
1:800	1	0,4	236	99,6
1:1600	1	0,4	237	100,0
Total	237	100,0		

TABELA 7

Prevalência da brucelose em suínos do Estado de Minas Gerais, de acordo com os testes de soro-aglutinação em tubo e do cartão - 1973/1974.

Ítems	Município	Número de amostras	Soro-aglutinação em tubo			Teste do Cartão				
			Positivo*	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
01	Araxá	18	1	5,6	17	94,4	1	5,6	17	94,4
02	Betim	25	0	0,0	25	100,0	0	0,0	25	100,0
03	Carmo do Parai- ba	38	12	31,6	26	68,4	14	36,8	24	63,2
04	Conceição das Alagoas	37	8	21,6	29	78,4	15	40,5	22	59,5
05	Contagem	3	0	0,0	3	100,0	0	0,0	3	100,0
06	Corinto	32	0	0,0	32	100,0	0	0,0	32	100,0
07	Coromandel	43	2	4,6	41	95,4	4	9,3	39	90,7
08	Cruzeiro da Fortaleza	18	0	0,0	18	100,0	0	0,0	18	100,0
09	Esmeraldas	26	0	0,0	26	100,0	0	0,0	26	100,0
10	Felixlândia	38	0	0,0	38	100,0	0	0,0	38	100,0
11	Formiga	28	6	21,4	22	78,6	7	25,0	21	75,0
12	Guimarânia	21	1	4,8	20	95,2	1	4,8	20	95,2
13	Ituiutaba	72	17	23,6	55	76,4	22	30,6	50	69,4
14	João Pinheiro	17	0	0,0	17	100,0	0	0,0	17	100,0
15	Lagoa Formosa	25	2	8,0	23	92,0	3	12,0	22	88,0
16	Pains	26	5	19,2	21	80,8	5	19,2	21	80,8
17	Patos de Minas	22	2	9,0	20	91,0	4	18,2	18	81,8
18	Ribeirão das Neves	11	1	9,1	10	90,9	2	18,2	9	81,8
19	Santa Luzia	20	0	0,0	20	100,0	0	0,0	20	100,0
20	Santa Vitória	83	22	26,5	61	73,5	25	30,1	58	69,9
21	S. Pedro Suassui	26	4	15,3	22	84,7	6	23,1	20	76,9
	T O T A L	629	83	13,2	546	86,8	109	17,3	520	82,7

* Título v¹ 1:100

TABELA 8

Frequência da brucelose em suínos do Estado de Minas Gerais, segundo o sexo, pelos testes de soro-aglutinação em tubo e do cartão.

T e s t e	S E X O					
	M a c h o			F ê m e a		
	Número de suínos	Positivos*	%	Número de suínos	Positivos*	%
Soro-aglutinação em tubo	33	7	21,2	36	5	13,9
Teste do cartão	33	8	24,2	36	6	16,6

* Título $\bar{}$ 1:100

5. DISCUSSÃO

Os testes clássicos de soro-aglutinação para brucelose apresentam falhas pela ocorrência de reações inespecíficas, segundo DEYOE (1967), e FRIBOURG-BLANC (1970).

Os testes do 2-ME, de Coombs, de imunofluorescência e do cartão são considerados altamente específicos. (HAJDU, 1963; SIMINTZIS & THIVOLET, 1965 e DEYOE, 1967).

Observando-se os dados da Tabela 3, verifica-se que o Teste de Coombs apresentou, geralmente, títulos superiores (até quatro diluições) ao método lento, em soros com títulos $\bar{>}$ 1:50 (pelo método lento). Isso se deve, provavelmente, à capacidade do teste revelar anticorpos completos e incompletos.

A limitação desse teste, para ser empregado na rotina deve-se à sua execução, que é laboriosa e demorada.

O teste de imunofluorescência mostrou, geralmente, títulos superiores (até três diluições) ao método lento e ao teste do 2-ME e títulos ligeiramente inferiores aos obtidos pelo teste de Coombs. O emprego de soro hiperimune de título elevado e diluído explicaria a maior sensibilidade deste teste em relação à soro-aglutinação clássica. BIEGELEISEN & cols. (1961) e MOODY & cols. (1961), afirmaram que o método indireto de imunofluorescência, aplicado ao diagnóstico da brucelose humana, apresentou títulos inferiores em relação ao método lento. Entretanto, SIMINTZIS & THIVOLET (1965), e FRIBOURG-BLAND (1970), encontraram títulos superiores à imuno -

fluorescência em relação à soro-aglutinação em tubo em bovinos. GENTILE (1965) verificou resultados concordantes entre esses dois métodos para o diagnóstico da brucelose bovina. Entre 15 soros com título baixo no método lento (1:25) 14 (93,3%) se mostraram negativos à imunofluorescência, resultados que estão de acordo com as observações de FRIBOURG-BLANC (1970) em soros de bovinos e com SIMINTZIS (1972) que examinou 37 soros de suínos reagentes ao teste clássico de aglutinação. Títulos baixos no teste clássico (1:25), não foram confirmados pelo teste do 2-ME, enquanto que, para diluições superiores, o teste apresentou títulos inferiores aos testes de Coombs e de imunofluorescência e iguais ou inferiores ao teste clássico. GARCIA CARRILLO & cols. (1971) trabalhando com suínos inoculados com Brucella suis, após 41 dias, verificaram que títulos 1:25 à soro-aglutinação em tubo foram negativos ao 2-ME e títulos 1:50 foram iguais ou ligeiramente menores a esse teste. Esses achados estão concordantes com os de GLAWISCHNIG & CORTES (1972) que, trabalhando com 634 soros de bovinos, verificaram que os resultados do teste do 2-ME mostraram boa correlação com altos títulos aglutinantes, mas não com títulos aglutinantes suspeitos, ou duvidosos.

O teste do cartão, quando empregado em 15 soros com título de 1:25 no método lento, se mostrou negativo, em 18 soros com título 1:50, 13 (72,2%) mostraram-se positivos e em 19 com títulos \geq 1:100 todos (100%) foram positivos.

Ainda com os dados da Tabela 3, verificou-se que, considerando-se o título 1:50 da soro-aglutinação em tubo como significativo, os quatro métodos empregados mostraram a seguinte concordância: teste do cartão 72,2% (13/18), teste de Coombs 66,6% (12/18), imunofluorescência 50,0% (9/18) e teste do 2-ME 27,8% (5/18). Quando se considera o título \geq 1:100 como significativo a concordância entre os métodos passa a ser a seguinte: teste do cartão 100,0% (19/19); teste de Coombs 94,7% (18/19); teste de imunofluorescência 94,7% (18/19) e teste do 2-ME 63,1% (12/19).

Os dados dessa tabela sugerem que títulos baixos (1:25) podem ser indicativos de reações inespecíficas, enquanto que títulos 1:50 podem ser ou não específicos, de vez dos 18 soros examinados com esse título 13 (72,2%) foram positivos, pelos menos a um dos testes. Com relação ao título 1:100, o mesmo se mostrou muito específico, comprovado pela alta concordância entre os testes empregados, exceção apenas para o teste do 2-ME. Assim, título \geq 1:100 pode ser considerado como significativo de infecção brucélica em suínos, o que está de acordo com KERNKAMP E ROEPKE (1948); MALKIN & cols. (1958); GALVEZ (1969); FAO/OMS (1971).

Os dados dessa Tabela, mostram que 26,6% (4/15) dos suínos com título 1:50 à soro-aglutinação em tubo foram negativos aos quatro testes complementares efetuados. Esse achado sugere que o título 1:50 à soro-aglutinação em tubo pode ser inespecífico, discordando dessa forma, da legislação brasileira sobre brucelose animal, que considera como positivo o suíno com título \geq 1:50 (BRASIL, 1958).

Na Tabela 4 são comparados diferentes títulos obtidos na prova de aglutinação clássica com os resultados do teste do cartão em 629 soros de suínos. Assim, observa-se que de 86 suínos reagentes a 1:25 apenas três foram positivos ao teste do cartão, o que equivale a uma concordância de 3,5%. Para títulos iguais a 1:50 a concordância foi de 38,2% e para títulos iguais a 1:100 verificou-se alta concordância (96,1%). Esses dados vêm confirmar as informações da tabela anterior, mostrando que títulos a partir de 1:50 podem ser específicos e que títulos \geq 1:100 são bastante significativos de infecção brucélica. Segundo LEHNERT (1959), reações sorológicas inespecíficas ocorrem em cerca de 50% de suínos sadios em diluições de 1:10, 1:20 e, raramente, 1:80. LADWIG (1968) afirmou que o teste do cartão poderia eliminar quase 95% dos problemas com a diluição 1:50 na soro-aglutinação rápida para brucelose suína. Para DEYOE (1967), o teste do cartão deve ser o preferido para ser empregado na rotina, como prova complementar, em razão de sua especificidade e grande simplicidade de execução.

Na Tabela 5, verifica-se que reações baixas ocorreram em maior proporção: 13,7% e 10,8% para diluições 1:25 e 1:50 respectivamente. Esses dados são concordantes com os de outros autores (MALKIN & cols. 1968 e FRANCO & CARRILLO, 1970). Entre os 237 suínos reagentes a qualquer título, 154 (65,0%) possuíam títulos \leq 1:50, o que ressalta a necessidade de se efetuarem testes complementares (Tabela 6).

A frequência da brucelose suína por município, de acordo com a soro-aglutinação em tubo e teste do cartão, vista na Tabela 7, mostra que o último foi mais sensível indicando 17,3% de positividade enquanto o primeiro mostrou 13,2% de positividade em 629 suínos examinados. Em razão do número reduzido de suínos, procedentes de Minas Gerais, abatidos em Belo Horizonte (5-10% do total) a amostragem por município foi pequena não permitindo uma avaliação real da frequência da doença em cada um. Entretanto, observa-se que para a soro-aglutinação a amplitude de variação foi de 0 a 31,6% e para o teste do cartão 0 a 40,5%. A prevalência encontrada (13,2%) para a brucelose em suínos, abatidos em matadouros, procedentes de Minas Gerais, é três vezes superior à encontrada por VALLE (1953) e seis vezes superior à do Ministério da Agricultura, (BRASIL, 1973).

Pela prova da soro-aglutinação em tubo, considerando-se o título \geq 1:100 como significativo, a frequência da brucelose foi de 21,2% e 13,9% respectivamente, para macho e fêmea. Pelo teste do cartão a frequência encontrada foi de 24,2% e 16,6% respectivamente, para macho e fêmea (Tabela 8). A diferença encontrada entre os sexos, pelos dois testes efetuados, não foi estatisticamente significativa ($P > 0,5$) o que está de acordo com GALVEZ, (1969)

6. CONCLUSÕES

1. Soros com títulos baixos (1:25) pelo método clássico apresentaram-se negativos na seguinte proporção, conforme os testes efetuados: teste do 2-ME 100%; teste do cartão 100%; teste de Coombs e imunofluorescência 93,3%.
2. Soros com título 1:50 pelo método clássico, foram reagentes aos quatro testes efetuados na proporção de 38,8%.
3. Títulos $\bar{>}$ 1:100 no método clássico apresentaram alta concordância entre os testes efetuados, exceção apenas para o 2-ME. Assim, a concordância encontrada para cada teste foi: teste do cartão 100%; teste de Coombs e de imunofluorescência 94,7% e teste do 2-ME 63,1%.
4. O teste do cartão apresentou baixa concordância (3,7%) com o método clássico, quando o título do soro era 1:25 e alta (96,1%) quando era 1:100. Em razão de sua alta especificidade, sensibilidade, simplicidade de execução e leitura, esse teste deve ser o escolhido como prova complementar à soro-aglutinação clássica.
5. Títulos baixos ($\bar{<}$ 1:50) são frequentes em suínos constituindo 24,4% do total examinado e 65,0% entre os reagentes.
6. A prevalência da brucelose em suínos de Minas Gerais, abatidos em matadouros, se mostrou muito mais elevada do que a registrada pela literatura, 13,2% pelo método clássico (título $\bar{>}$ 1:100) e 17,3% pelo teste do cartão.

7. Não se observou diferença estatisticamente significativa de prevalência da brucelose em suínos de acordo com o sexo.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de reações inespecíficas à soro-aglutinação (método lento) para o diagnóstico da brucelose suína e a frequência da mesma no Estado de Minas Gerais, foram colhidas 629 amostras do sangue de suínos, abatidos em matadouros de Belo Horizonte.

Foram examinados inicialmente, 62 soros, através dos seguintes testes: aglutinação em tubo, imunofluorescência, Coombs, 2-mercaptoetanol (2-ME) e teste do cartão. Quando a soro-aglutinação em tubo o título era igual a 1:25, os demais testes eram, geralmente, negativos. Entretanto, título igual a 1:50, mostrou concordância média entre os testes, com exceção para o 2-ME, e que foi a seguinte: teste do cartão 72,2%, Coombs 66,6%, imunofluorescência 50% e 2-ME 27,8%. Foi encontrada alta concordância, quando o título era \geq 1:100, com exceção para o 2-ME. Assim, a concordância encontrada foi a seguinte: teste do cartão 100%, Coombs 94,7% imunofluorescência 94,7% e 2-ME 63,1%. Os testes de Coombs e de imunofluorescência apresentaram, geralmente, títulos mais elevados em relação ao teste de soro-aglutinação em tubo, enquanto que o teste do 2-ME apresentou, em relação ao último, títulos iguais ou inferiores.

Os testes de soro-aglutinação em tubo e do cartão apresentaram alta concordância (96,1%) ao título \geq 1:000, em 629 suínos examinados.

A prevalência da brucelose foi de 13,2% pela soro-aglutinação em tubo e 17,3% pelo teste do cartão. A frequência encontrada foi seis vezes maior em relação aos dados oficiais, do Ministério da Agricultura. Não houve diferença estatisticamente significante, com relação ao sexo em 69 amostras examinadas.

To check the occurrence of non-specific reactions in the slow agglutination test for the diagnosis of swine brucellosis and its prevalence in the State of Minas Gerais, 629 blood samples were collected from swine slaughtered in Belo Horizonte.

First 62 sera were examined through the following tests: slow agglutination test (SAT) indirect fluorescent antibody technique (IFAT) antiglobulin test (AGT), 2-mercaptoethanol test (2-ME)

When SAT titer was 1:25 the other tests, generally, were negative. However, titers equivalent to 1:50 showed regular agreement among the tests, with exception of ME. Thus the agreement found was CT 72.2%, AGT 66.6%, IFAT 50.0% and ME 27.8%. Good agreement was found when the titer was \geq 1:100, with the exception of the 2-ME test. Thus the agreement found was as follows: CT 100%, AGT 94.7%, IFAT 94.7% and 2-ME 63.1%. The AGT and IFAT showed, in general, higher titers in relation to SAT, whereas the 2-ME test showed in relation to the latter, equivalent or lower titers.

The SAT and CT showed good agreement (96.1%) at a titer \geq 1:100 in 629 swine sera examined.

The prevalence of brucellosis was 13.2% in the SAT and 17.3% in the CT. The prevalence found was 6 times greater in relation to official data, from the Federal Department of Agriculture. There was no significant statistical difference in relation to sex in 69 samples examined.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMANS, J.P.W.M. & HILL, W.K.W., 1972. Yersinia enterocolitica serotype 9 infection as a factor interfering with the serodiagnosis of Brucella infections in swine Netherlands Brucella suis. Neth. J. Vet. Sci., 5(1):73-80
- ALTON, G.G. & JONES, L.M., 1969. Las tecnicas de laboratorio en la brucelosis. Serie de Monografias de la OMS. n° 55. Ginebra.
- ANDERSON, R.K., JENNESS, R.K., BRUMFIELD, H.P. & GOUCH, P., 1964. Brucella-agglutinating antibodies: Relation of mercaptoethanol stability to complement fixation. Science 143(3612):1334-1335.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1972. Instituto de Geografia e Estatística. Vol.33. Rio de Janeiro. 989 págs.
- BARSINI, G. & FOCACCI, A. 1954. Ricerche sulla brucellosi suina in provincia di Siena. Ann. Fac. Med. Vet. Pise 7 :124-128
- BIEGELEISEN, J.Z., BRADSHAW, B.R. & MOODY, M.D., 1962. Demonstration of Brucella antibodies in human serum. A comparison of the fluorescent antibody and agglutination techniques. J. Immunol. 88:109-112.
- BRASIL, 1958. Ministério da Agricultura. Portaria n° 438 de 22.04. 1958. Instruções para o combate à brucelose animal. Diário Oficial 25/04/1958:9411-9413.
- BRASIL, 1973. Ministério da Agricultura. Bol. Def. Sanit. Ani. Ano VII Dez. (1-4):31

- BUSCH, L.A. & PARKER, R.L. 1972. Brucellosis in the United States. Review. J. Inf. Dis. 125 (3):289-294
- CAFFARENA Y BACHERS, R.M., AGORIO, M. & BARRIOLA, J., 1967. Comprobaciones serologicas de brucelosis y leptospirosis en suinos de la Republica Oriental del Uruguay. Gac. Vet. Uruguay. - 29(204):289-298.
- CALDAS, A.D., 1963. Combate à brucelose suína. O Biológico, 29:164-166.
- COOMBS, R.R.A., MOURANT, A.E. & RACE, R.R., 1945. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Brit. J. Exp. Pathol. 26:255-266
- CORSTVET, R.E. & SADLER, W.W., 1964. The diagnosis of certain diseases with the fluorescent antibody technique. Poultry Sci. , 43:1280-1288.
- CUNHA, J.B. & BIFONE, J. 1950. Brucelose e o trabalho em matadouros. Bol. Div. Def. Sanit. Ani., Ano 1:66-87.
- DEYOE, B.L., 1967. Swine brucellosis. WHO/Bruc./67(303):1-5.
- FAO/OMS, 1971. Comité Mixto de Experts en Brucellosis. Quinto informe. OMS. Serie Informes Técnicos nº 464.
- FRANCO, J.P. & CARRILLO, C.G., 1970. Encuesta serologica de brucelosis en cerdos sacrificados en algunos frigorificos de la ciudad de Buenos Aires. Rev. Med. Vet. Buenos Aires, 51(1):5-10.
- FRIBOURG-BLANC, A., 1970. Diagnostic serologique de la brucellose bovine par la reaction d'immunofluorescence. Int. Symp. Brucellosis, Tunis. 1968, Symp. Series Immunobiol., standard, 12:373-378.
- GÁLVEZ, G.O.E., 1969. Brucelosis en cerdos de abasto de la ciudad de Guatemala. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Guatemala, 2(3): 34-36.

- GARCIA-CARRILO, C., CEDRO, V.C.F. & BENEDETTI, L.M.E., 1971. Brucellosis experimental en porcinos. II. Evaluación de técnicas serológicas en cerdas con infección reciente de Brucella suis. - Rev. Inv. Agropec. Buenos Aires. Série 4, Pat. Ani., 8(4) 99 - 107.
- GENTILE, G., 1965. Indirect fluorescent antibody technique for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Ital. 16:248-266.
- GLAWISCHNIG, E. & CORTES, A., 1972. Untersuchungen über die brauchbarkeit des mercaptoaethanoltestes zur erkennung unspezifischer brucellose-reagenten. (Value of the mercapthethanol test in the detection non-specific brucellosis reactions). Dtsch. Tierarztl. Waschr. 79(15):361-365.
- GOLDMAN, M., 1968. Fluorescent Antibody Methods. Academic Press ed. New York and London. 303 págs.
- HAJDU, S., 1963. La specificité et la valeur des epreuves a l'antiglobuline modifiées par l'auter dans le diagnostic de la brucellose des bovines. Bull. Off. Int. Epiz., 60:433-445.
- HIPÓLITO, O., FIGUEIREDO, J.B. & GODOY, A.M. 1951. Investigações sobre brucelose suína em Minas Gerais. Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG - Belo Horizonte, 4:57-65.
- HIPÓLITO, O., da SILVA, J.M.L. & BARBOSA, M. 1958. Sobre dois casos de orquite brucélica em suínos. Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG. Belo Horizonte, 11:345-349.
- HOERLEIN, A.B., 1953. Studies on swine brucellosis. III. The differentiation of specific and non-specific agglutination titers. Cornell Vet., 43(1):28-37.
- KENYON, A.J., ANDERSON, R.K. & JENNESS, R., 1961. A macroglobulin (12 S) agglutinin for Brucella bovine milk. J. Dairy Sci., 44: 1141-1142.

- KERNKAMP, H.C.H. & ROEPKE, M.H., 1948. The interpretation of low agglutination titers in the control of swine brucellosis. Amer. J. Vet. Res., 9:46-48.
- LADWIG, V.D., 1968. Card brucellosis test-swine. Iowa Vet., 30(6): 9-14.
- LEHNERT, C., 1959. Zur serologischen diagnose bei schweinebrucellose. (Serological diagnosis of brucellosis in pigs). Mh. Vet. Med. 1:65-69. Resumo in Vet. Bull. 30(7):374, 1960.
- MALKIN, K.L., TAILYOUR, J.M., BHATIA, T.R.S., ARCHIBALD, R. McG. & DORWARD, W.J., 1968. A serological survey for brucellosis in canadian swine. Can. J. Comp. Med. 32(4): 598-599.
- MOODY, M.D., BIEGELEISEN, J.Z. & TAYLOR, G.C., 1961. Detection of Brucellae and their antibody by fluorescent antibody and agglutination tests. J. Bacter., 81:990-995.
- MOSCI, A. 1944. Em torno da incidência das bruceloses em animais. Bol. Soc. Bras. Med. Vet. 13(2):105-117
- NEIVA, C., 1934. Aglutininas para o gênero Brucella em soro de animais. Rev. Ind. Ani., 2(1):81-88.
- OUCHTERLONY, O. 1953. Antigen antibody reactions in gels. Acta. Pathol. Microb. Scand. 32:231-240
- PENNEC, J., 1966. Possibilité d'emploi du test de Coombs à un tube sur sérum chauffé 10 minutes -69°C en serologie antibrucellique bovine et ovine. Étude comparative avec le S.A.W. en eau salée à 50/1000 de NaCl. Bull. Acad. Vet., 39:85-90.
- PILET, Ch., PERRON, P., CADEILLAN, J., JULIENNE, P., OLLIVIER, R. & GORET, P., 1963. Premiers resultats d'une enquête sérologique sur l'epizootiologie de la brucellose porcine en France. - Rec. Med. Vet., 139:993-1003.

- ROSE, J.E. & ROEPKE, M.H., 1957. An acidified antigen for detection of non-specific reactions in the plate agglutination test for bovine brucellosis. Amer. J. Vet. Res., 18:550-555.
- SIMINTZIS, G., 1972. Enquête serologique sur brucelose porcine. Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon, (4):297-301.
- SIMINTZIS, G. & THIVOLET, J., 1965. Diagnostic sérologique de la brucellose bovine par la méthode des anticorpos fluorescents. Comparaison avec le sérodiagnostic de Wright. Rec. Med. Vet., 41:35-43.
- SONI, J.L. & PATHAK, P.N., 1969. Serological investigation into porcine brucellosis. Indian Vet. J., 46:191-195
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, NATIONAL ANIMAL DISEASES LABORATORY. Diagnostic Reagentes Division, Ames, Iowa, sem data. Diagnostic Reagents Manual: 65.
- VALLE, A.L., 1953. O inspetor de laticínios em face da brucelose. Bol. Leite, ano 7(77):9-14.