



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA**  
**AGROPECUÁRIA**

**MARCUS PAULO DE MATOS MATURINO**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE BRUCELOSE**  
**EM AMOSTRAS DE BOVINOS ABATIDOS EM MATADOUROS**  
**INSPECIONADOS NO ESTADO DA BAHIA**

Cruz das Almas – Bahia

Setembro - 2014

**MARCUS PAULO DE MATOS MATURINO**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE  
BRUCELOSE EM AMOSTRAS DE BOVINOS ABATIDOS  
EM MATADOUROS INSPECIONADOS NO ESTADO DA  
BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do curso de mestrado profissional em Defesa Agropecuária do Centro de ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em defesa agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Cruz das Almas – Bahia

Setembro - 2014

## **DEDICATÓRIA**

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

- À DEUS, por ter colocado pessoas especiais na minha vida!
- Ao professor Robson Bahia, que sempre me apoiou e acreditou em mim, meu muito obrigado!
- Aos meus pais, Nanci e Orlando, meu eterno agradecimento, por me tornarem o que sou hoje.
- À Nara, por ser tão importante na minha vida, pela paciência, companheirismo, compreensão e pelo amor!
- À Heitor, pelos momentos de alegria, distração, pelo "seqüestro" do computador e de suas tentativas de ajudar a digitar essa dissertação.
- À Dinda pela confiança e disponibilidade, meu muito obrigado!
- À Manuela, Eduardo e Lucas, pelos momentos de alegria durante esse processo.
- Aos demais familiares, pelo incentivo e apoio.
- Aos meus fiéis escudeiros Junior, Bianca, Diana, Juliana, Vinicius, sem o apoio deles o trabalho não seria possível.
- Ao Médico Veterinário Leonardo Rosa França, pela disponibilidade.
- Ao professor Jorge Ribas, pelo apoio.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia FAPESB, pela bolsa concedida.
- Todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

A brucelose é uma doença bacteriana de grande impacto para a economia pecuária e para a saúde pública por se tratar de uma zoonose. É uma doença infecto-contagiosa que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Brucella*. Em bovinos, a espécie do gênero é a *Brucella Abortus* que são cocobacilos gram negativo, intracelulares facultativos, imóveis e não esporulados. A infecção apresenta evolução crônica e acomete animais de todas as idades, sendo mais frequente em indivíduos sexualmente maduros. O presente trabalho teve como objetivo investigar por meio da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, com amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia. Inicialmente, foram utilizados 30 soros de bovinos positivamente confirmados para brucelose bovina e 30 de bovinos negativos a sorologia para brucelose, ambos foram submetidos ao ELISA indireto com a utilização de dois antígenos produzidos a partir de cepas de *brucella* rugosas e lisas, posteriormente foi utilizado o teste com antígeno liso, em 666 animais, selecionados aleatoriamente no momento do abate. O sangue foi coletado com a finalidade de obtenção de soro, todas as amostras foram submetidas à prova de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova do 2mercaptoetanol (2-ME) e ELISA indireto. O ponto de corte do Elisa liso foi de 0,223 e o do Elisa rugoso foi de 0,181, a sensibilidade foi de 33,33% e 23,33% e especificidade foi de 86,66% e 100% nos antígenos liso e rugoso respectivamente. Das amostras reagentes no teste do AAT, obteve-se uma prevalência estimada em 1,2%. A prevalência no teste do ELISA foi de 13,21% (n=86). Esse resultado sugere a ocorrência de falsos negativos quando se utiliza a prova do antígeno acidificado tamponado. Esses valores sugerem a utilização do ELISA indireto como prova de triagem para brucelose bovina, já que o mesmo demonstra a capacidade de diagnosticar animais naturalmente infectados de não infectados.

**Palavras-chave:** Teste Elisa; Brucelose bovina; *Brucella abortus*; Diagnóstico; Abate

## ABSTRACT

Brucellosis is a bacterial disease of great impact to the livestock economy and to public health because it is a zoonosis. It is an infectious disease that has etiologic agent with bacteria of the genus *Brucella*. In cattle, the species of the genus *Brucella* is *Abortus coccobacilli* that are gram negative, facultative intracellular, real estate and nonsporing. The infection presents chronic and affects animals of all ages, being more frequent in sexually mature individuals. This study aimed to investigate by serology for bovine brucellosis using the technique of indirect ELISA with samples from positive animals in slaughterhouses inspected in the state of Bahia. Initially, 30 sera from confirmed positive and negative confirmed bovine cattle used were 30, were both subjected to ELISA with use of two antigens produced from rough and smooth strains of *Brucella*, after testing with smooth antigen was used in 666 animals, randomly selected at slaughter. Blood was collected in order to obtain serum, all samples were subjected to a screening test Antigen Buffered Acidified (AAT), proof of 2mercaptoetanol (2-ME) and indirect ELISA. The cutoff smooth Elisa was 0.223 and the rough Elisa was 0.181, sensitivity was 33.33% and 23.33% and specificity was 86.66% and 100% respectively in smooth and rough antigens. Of reagents in the test samples of AAT obtained an estimated prevalence of 1.2%. The prevalence in the ELISA test was 13.21% (n = 86). This result suggests the occurrence of false negatives when using the buffered acidified antigen test. These values suggest the use of indirect ELISA as a screening test for bovine brucellosis, since it demonstrates the ability to diagnose naturally infected animals from uninfected.

**Keywords:** Test Elisa; Bovine brucellosis; *Brucella abortus*; diagnosis; Abate

# LISTA DE TABELAS

Artigo I

**Tabela 1.** Valores de sensibilidade, especificidade e cut-off.

**Tabela 2.** Valores preditivos positivos e negativos.

Artigo II

**Tabela 1.** Prevalência para brucelose no teste do ELISA por Mesorregião.

**Tabela 2.** Correlação entre as variáveis.

# LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Prevalência da brucelose bovina em relação aos testes do AAT e 2-ME.

**Gráfico 2.** Valores de absorbância de soro de bovinos reagentes ao Teste ELISA indireto.

**Gráfico 3.** Análise de regressão SAL e ELISA.

**Gráfico 4.** Análise de regressão 2-ME e ELISA.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**2-ME** – 2-MERCAPTOETANOL.

**ATT** – ANTIGENO ACIDIFICADO TAMPONADO.

**APCS**- CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO.

**DIPOA**- DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

**DDSA** - DIVISÃO DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL.

**ELISA** – ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY).

**LPS** – LIPOPOLISSACARÍDEO.

**BHI**- MEIOS DE CULTURA ÁGAR CÉREBRO CORAÇÃO.

**MAPA** - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

**OIE** - ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DAS EPIZOOTIAS (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH).

**PNCETB** - PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E DA TUBERCULOSE ANIMAL.

**PCR** - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

**RIISPOA** - REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

**SAL** – SOROAGLUTINAÇÃO LENTA EM TUBOS.

**TAL** – TESTE DO ANEL DO LEITE.

# SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3.REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Histórico	5
3.2 Agente Etiológico	6
3.3 Aspectos Imunológicos	8
3.3.1 Perfil Humoral	10
3.3.2 Perfil Celular	11
3.4 Epidemiologia	13
3.5 Patogênese	18
3.6 Sinais Clínicos	19
3.7. Achados de Necropsia	22
3.8. Diagnóstico	23
3.8.1. Diagnóstico Clínico	23
3.8.2. Diagnóstico Laboratorial	24
3.8.2.1. Diagnóstico Microbiológico	24
3.8.2.2. Diagnóstico Sorológico	26
3.8.2.2.1. Diagnóstico Aglutinação	27
3.8.2.3 Imunofluorescência Direta e Indireta	29
3.8.2.4 Imunoensaios	30
3.8.2.5 Técnicas Moleculares	32
3.9. Medidas de Controle e Prevenção	33
4. CAPÍTULO I	36
Artigo I	37
5. CAPÍTULO II	54
Artigo II	55
REFERÊNCIAS	72

## 1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*, de evolução crônica, sendo caracterizada como uma zoonose que é responsável por perdas de divisas na produção animal. No homem, a sua manifestação clínica é responsável pela incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2006). É uma enfermidade que faz parte da lista de doenças Organização Internacional das Epizootias (OIE) (2014a), é uma doença transmissível, que possui importância socioeconômica e/ou de saúde pública em países cujo comércio internacional de animais e de produtos de origem animal é significativo (OIE, 2014b).

A bactéria possui predileção pelo sistema reprodutivo de animais com maturidade sexual sem predileção pelo sexo (QUINN *et. al.*, 2011). A infecção por *Brucella abortus* causa inúmeras perdas na produção animal, estas perdas estão relacionadas à baixa eficiência reprodutiva dos animais, com consequente diminuição da produção do rebanho, aumento dos intervalos entre partos em decorrência de abortos, diminuição da produção leiteira, além de nascimento de bezerros fracos, o que prejudica o desenvolvimento e reduz o número de bezerros disponíveis para comercialização (LAGE *et. al.*, 2008).

Além de gerar barreiras para o comércio internacional de produtos de origem animal e perdas na indústria com condenação do leite e da carne, há a consequente queda de preços destes produtos e de seus derivados, e altos custos com programas de controle, erradicação e pesquisas (JARDIM, 2006).

A brucelose causa problemas relacionados à desvalorização de animais provenientes de fazendas nas quais existam casos positivos da doença e, nas regiões em que esta se encontra de forma endêmica, existindo desvantagem na disputa por novos mercados, esses relacionados com as barreiras sanitárias (CORDEIRO, 2014). Em 2003, Homem relatou impactos econômicos na ordem de R\$ 132.676,23, quando analisado o município de Pirassununga no estado de São Paulo e Lucas (2006) encontrou valores na ordem de 5 a 14% de prejuízo, dependendo da prevalência da região.

Ante exposto, e considerando que o Brasil é detentor do título de maior rebanho bovino comercial do mundo, surge a necessidade de um levantamento da situação soroepidemiológica da Brucelose do estado da Bahia, abordando animais abatidos em frigoríficos, com um serviço oficial de inspeção, já que os últimos levantamentos datam de 2009. Aliado a isso, a necessidade de um teste de triagem com capacidade de diagnosticar de forma precisa e confiável a brucelose bovina, já que essa enfermidade pode infectar o homem via produtos de origem animal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo investigar através da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Avaliar nos animais abatidos a soropositividade ao teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME), Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL);
- 2- Padronizar o ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose bovina, utilizando um antígeno comercial produzido a partir de uma linhagem lisa e uma linhagem rugosa;
- 3- Correlacionar amostras reagentes nos teste de AAT e 2-ME com o ELISA padronizado;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BREVE HISTÓRICO

A brucelose foi inicialmente descrita no início do século XIX, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta, chamada também designada febre ondulante, do mediterrâneo ou Doença de Bang (ALMEIDA, 2009). Porém, há relatos mais antigos, anteriores a era Cristã em ossos provenientes do antigo Egito (750 a.C.), em que foram evidenciadas lesões osteoarticulares, sugestivas de Brucelose (PAPPAS e PAPADIMITRIOU, 2007).

A primeira descrição clínica da doença foi feita por Marston em 1859 e o isolamento do agente etiológico foi realizado por Bruce em 1887, que o denominou "*Micrococcus melitensis*". A bactéria foi mais tarde renomeada como *Brucella melitensis* em sua homenagem. Em 1905, Zammit demonstrou, ainda em Malta, a natureza zoonótica da *B.melitensis* através do isolamento da bactéria do leite de cabras. Em 1917, os veterinários dinamarqueses Bang e Stribolt isolaram o agente causador do aborto enzoótico dos bovinos e o chamaram de "Bacillus abortus", mas, em 1918, a pesquisadora norte-americana Alice Evans publicou um trabalho importante para o conhecimento da brucelose, ela demonstrou as semelhanças morfológicas, imunológicas e de cultivo entre as bactérias isoladas por Bruce e Bang. Em razão disto, Meyer e

Shaw propuseram em 1920, a criação do Gênero *Brucella*, em homenagem ao autor do primeiro isolamento do agente (MANUAL DE ZONÓSES, 2009; BRASIL, 2010).

Já no Brasil, Danton Seixas diagnosticou clinicamente pela primeira vez a brucelose bovina no Rio Grande do Sul, em 1914. Três anos depois, no Ceará, Thomaz Pompeu Sobrinho observou casos raros de abortamento bovino, sendo mais comum em equinos e frequente em ovinos. O primeiro estudo sobre brucelose bovina no Brasil foi feito por Tinécio Icibaci que, através de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos de tecidos provenientes de fetos abortados, descreveu um foco de brucelose bovina ocorrido no município de São Carlos, SP, em 1922. Mello e Neiva, em 1928, isolaram *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia abortado (PAULIN e FERREIRA NETO, 2002).

### 3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

As classificações mais recentes indicadas na "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" apontam a existência de 10 espécies da *Brucella*, sendo elas: *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella ceti*, *Brucella inopinata*, *Brucella melitensis*, *Brucella microti*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella suis* (LPSN, 2014). As três espécies principais, também denominadas clássicas, são subdivididas em biovars: *B. abortus* – 7 biovars;

*B. melitensis* – 3 biovares; *B. suis* – 5 biovares ; *B. Ovis* – 1 biovar; *Brucella canis* – 1 biovar (QUINN, 2011).

Em bovinos, o agente etiológico é caracterizado como parasitos intracelulares facultativos, sem capacidade de locomoção e nem de formar esporos. A sua morfologia é de pequenos cocobacilos, com coloração negativa de Gram. Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificadas como catalase e oxidase-positivos e não fermentadores de lactose. A *B. abortus* é isolada em três a cinco dias no ágar-Brucella ou no meio convencional de ágar enriquecido com sangue ovino, bovino ou equino a 5% (desfibrinado), em condições de microaerofilia a 37° C. A partir de três dias de incubação, as colônias apresentam 2 a 3mm de diâmetro, são opacas, lisas, não hemolíticas bioquimicamente, *B. abortus* é uréase-positivo e indol-negativo. As bactérias do gênero *Brucella*, são bastante resistentes, quando satisfeitas às condições ideais, podem permanecer no ambiente, não se multiplicam nele, são medianamente sensíveis aos fatores ambientais, entretanto a resistência diminui quando aumentam a temperatura e a luz solar direta ou diminui a umidade (BRASIL, 2006; RIBEIRO *et. al.*, 2008; QUINN, 2011).

Podem apresentar-se em cultivos com morfologia colonial lisa ou rugosa, essa morfologia está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo da parede celular, e para algumas espécies tem relação com a virulência. As bactérias do gênero *Brucella* não são hospedeiro-específicas e sob determinadas condições podem transmitir-se a outras espécies animais

(MANUAL DE ZOONOSES, 2009). Apesar do principal hospedeiro reservatório da *B. abortus* ser o bovino, outros animais domésticos também podem ser infectados e eventualmente transmitir a doença novamente ao bovino. Entre as espécies que tem alguma importância na epidemiologia da brucelose bovina, podem ser citados: os equídeos, que podem apresentar lesões articulares abertas, principalmente de cernelha; os cães, que podem abortar pela infecção; e os saprófagos, pela possibilidade de levar restos de placenta ou feto de um lugar para outro (BRASIL, 2006).

### **3.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS**

A *Brucella Abortus* é uma  $\alpha$ - Proteobacteria intracelular que causa infecções de longa duração, a cronicidade da infecção resulta da capacidade da Brucella sobreviver no interior de macrófagos, devido ao seu lipopolissacarídeo (LPS) peculiar com propriedades e estrutura distintas do LPS de outras enterobactérias, incluindo uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação pelos macrófagos e evasão da resposta imune, o que constitui um dos principais mecanismos de virulência e replicação da Brucella. (KO E GARY, 2003; BARQUERO-CALVO *et. al.*, 2014).

Um número substancial de componentes antigênicos de Brucella foram caracterizados, os componentes estruturais dos lipopolissacáridos da parede celular da bactéria são responsáveis por desencadear uma resposta humoral no

hospedeiro. As linhagens de *Brucella* spp. podem ser classificadas em lisas (*B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*) ou rugosas (*B. canis* e *B. ovis*), dependendo da presença ou ausência da cadeia de polissacarídeo O na molécula de lipopolissacarídeo (LPS), de acordo com os estudos de ressonância magnética nuclear, a cadeia de polissacarídeo é um homopolímero de N-formil-perosamina, esta cadeia de polissacarídeo O, contem três tipos básicos de epitopos sobrepostos sendo eles: C (comum a todos os tipos de químicas de *Brucella*), M (presente naquelas cadeia de polissacarídeo O com ligações (1-3)) e A (presente naquelas cadeia de polissacarídeo O sem ligações (1-3)). Os estudos de ressonância magnética nuclear também mostram que o LPS de *Yersinia enterocolitica* O, 9 carrega um homopolímero de N-formil-perosamina em (1-2) e as ligações, em conformidade, deve ser idêntico ao polissacarídeo O, tais como aqueles de *B. abortus*, o núcleo de oligossacarídeos; e a porção glicolípídica interna, chamada de lipídio A, esse LPS peculiar do gênero *Brucella* confere a essa bactérias proteção contra agentes antimicrobianos (GODFROID *et. al.*, 2002; SIADAT *et. al.*, 2013; ANTUNES e MEGID, 2013).

Como afirma Siadat (2013) as bactérias do gênero *Brucella* oriundas de colônias rugosas são naturalmente atenuadas, esta atenuação é atribuída ao aumento em ambos: o anticorpo de ativação do complemento e a sensibilidade independente a peptídeos bactericidas policatiônicos.

### 3.3.1 PERFIL HUMORAL

A ativação de uma resposta imunológica frente a uma infecção por *Brucella Abortus* pode ser classificada resumidamente na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos TCD4 $^{++}$ , TCD8 $^{+}$  e T $\gamma\delta$  que ativa as funções efectoras dos macrófagos e promove a diferenciação da célula Th0 em células Th1, destruição de macrófagos infectados pela citotoxicidade mediada por células TCD8 $^{+}$  e pelo direcionamento da produção de isotipos de anticorpos do tipo Th2 que são preferencialmente produzidos na resposta humoral contra microrganismos intracelulares e a subsequente opsonização do patógeno, facilitando a fagocitose (OLIVEIRA, 2011).

A maioria das imunoglobulinas presentes no soro de bovinos e bubalinos pertencem ao isotipo IgG (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) (BRASIL, 2006). A resposta humoral de bovinos infectados por *B. abortus* ou vacinados com a cepa S19, caracteriza-se pela síntese dos quatro isotipos principais de imunoglobulinas. A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação, se dá a partir da primeira semana, aparecendo, em primeiro lugar, o isotipo IgM e, logo após, o IgG1, superando entre 4 e 6 semanas os títulos do IgM e permanecendo como anticorpos dominantes na infecção. Bovinos infectados possuem altos títulos de IgG. Estes anticorpos aglutinantes não possuem

atividade opsonizante e nenhum efeito sobre a eliminação do organismo (GOMES, 2013).

A primeira resposta de anticorpos IgM sendo seguida anticorpos IgG1 e mais tardiamente, pelos isotipos IgG2 e IgA em menor proporção, sendo que os anticorpos da classe IgM são menos específicos. Em animais vacinados com a vacina B19, a observação no aspecto imunológico por longos períodos permitiu a observação de que o nível de anticorpos decresce rapidamente em animais vacinados até 8 meses, atingindo títulos inferiores a 25 UI depois de 12 meses. Por outro lado, se a vacinação for realizada acima de 8 meses de idade, os títulos vacinais tendem a permanecer elevados por mais tempo, podendo gerar reações falso-positivas nos testes indiretos de diagnóstico (BRASIL, 2006).

### **3.3.2 PERFIL CELULAR**

A *Brucella* ssp. possui genes de virulência que são importantes para a interação patógeno-hospedeiro e produção de fatores de virulência que modificam a fagocitose, a fusão do fagolisossoma, secreção de citocinas e apoptose (GORVEL e MORENO, 2002; MARIA-PILAR *et. al.*, 2005), por ser uma bactéria intracelular a *Brucella Abortus* estimula a imunidade mediada por células (ANTUNES e MEGDI, 2013).

A imunidade inata é a primeira defesa do organismo com atuação imediata contra o patógeno, reconhecendo-o por meio de receptores específicos, denominados receptores do tipo "TOLL" localizados na superfície das células

apresentadoras de antígeno (APCs). A ligação dos receptores a este patógeno induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa (WERLING e JUNGI, 2003).

As bactérias penetram nas células do hospedeiro através da interação com domínios discretos na superfície celular, denominados os receptores *lipid rafts*, e acredita-se que os *lipid rafts* desempenham um papel importante não apenas para a internalização, mas também para a replicação intracelular da *Brucella* (CUTLER *et. al.*, 2005). Já Lapaque *et. al.* (2005) sugerem que parte da interação entre as membranas da bactéria e do hospedeiro, seja mediada por ligações entre o lipídio A, componente do lipopolissacarídeo da membrana externa da bactéria, e receptores *lipid rafts*. A partir dessa interação entre as membranas, quando bem sucedida, é o que determina o destino intracelular da bactéria (KIM *et. al.*, 2002).

Após a internalização, as bactérias são endocitadas por macrófagos regionais e transportadas para linfonodos regionais, próximos à porta de entrada da infecção. Caso as bactérias não sejam eliminadas neste estágio ocorrerá a sua disseminação pelo sistema mononuclear fagocitário no qual ocorre a sua multiplicação. Bactérias opsonizadas são internalizadas via receptores para complemento e para fragmento cristalizável dos anticorpos presentes em células mononucleares, enquanto que bactérias não opsonizadas penetram em macrófagos via receptores de lectina ou fibronectina (GORVEL e MORENO, 2002). Logo após ocorre um redirecionamento da bactéria para compartimentos

membranosos, definido como via endocítica clássica, determinada em parte pela cadeia-O e pelo lipídeo A do LPS, sendo primeiramente localizada nos endossomos primários, em que a fusão com lisossomos é inibida pela rápida acidificação do fagossomo. Deste modo, a *Brucella* se multiplica no autofagossomo e no retículo endoplasmático (MARIA-PILAR *et. al.*, 2005).

### **3.4 EPIDEMIOLOGIA**

A brucelose é uma doença de distribuição mundial ocorrendo principalmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, e partes do México, da América Central e do Sul, sendo erradicada em alguns países como Finlândia, Noruega, Suécia, Dinamarca, Países Baixos, Bélgica, Suíça, Alemanha, Áustria, Hungria, Romênia e Bulgária, outros conseguiram liberar vários rebanhos e extensas áreas do seu território Inglaterra, Irlanda, Polônia, Canadá, Cuba, Panamá, Austrália e Nova Zelândia sendo o primeiro passo no processo de erradicação da doença (LOBATO e ASSIS, 2013; SIADAT *et. al.*, 2013). Os Estados Unidos, que caminhava para o processo de erradicação da brucelose e até o ano de 2000 não registrava mais casos de doenças no seu território, teve este estado comprometido, com a ocorrência de novos casos no estado do Texas, sendo estes relacionados a reservatórios silvestres de alces e bisões em regiões próximas às do Parque Nacional de Yellowstone (TACH, 2014).

No Brasil, inquéritos soroepidemiológicos realizados no período de 2001 a 2004, em 13 unidades federativas do país, já demonstraram que a doença está disseminada em todos os Estados e que a situação é heterogênea entre as áreas estudadas, e entre regiões de um mesmo Estado (BRASIL, 2006). Porém dados mais atualizados de investigação soroepidemiológica revelam quantitativamente as prevalências em diferentes estados do país. As prevalências obtidas foram: no estado da Bahia, 0,66% (total de 10.816 animais examinados) (ALVES *et. al.*, 2009); no Distrito Federal, 0,16% (2.019 animais examinados) (GONÇALVES *et. al.*, 2009a); no Espírito Santo, 3,5% (5.351 animais examinados) (AZEVEDO *et. al.*, 2009); em Goiás, 1,4% (10.744 animais examinados) (ROCHA *et. al.*, 2009); em Minas Gerais, 1,1% (20.643 animais examinados) (GONÇALVES *et. al.*, 2009b), no Mato Grosso do Sul, 7,6% (9.466 animais de corte examinados) (CHATE *et. al.*, 2009); no Mato Grosso, 10,2% (13.684 animais examinados) (NEGREIROS *et. al.*, 2009); no Paraná, 1,7% (14.857 animais examinados) (DIAS *et. al.*, 2009b); no Rio de Janeiro, 4,1% (8.239 animais examinados) (KLEIN-GUNNEWIEK *et. al.*, 2009); em Rondônia, 6,2% (9.717 animais examinados) (VILLAR *et. al.*, 2009); no Rio Grande do Sul, 1,0% (16.072 animais examinados) (MARVULO *et. al.*, 2009); em Santa Catarina, 0,06% (7.801 animais examinados) (SIKUSAWA *et. al.*, 2009); no Sergipe, 3,4% (4.757 animais examinados) (SILVA *et. al.*, 2009a); em São Paulo, 3,8% (8.761 animais examinados) (DIAS *et. al.* 2009a); e no Tocantins, 4,4% (20.908 animais examinados) (OGATA *et. al.*, 2009).

A brucelose durante algum tempo foi considerada uma doença ocupacional, caracterizada por aquelas profissões que tinham um contato direto com os

animais ou produtos oriundos dos mesmos ou com o microrganismo como: veterinários, vaqueiros, magarefes, ordenhadores, técnicos em laboratórios dentre outros, porém nas últimas décadas a brucelose deixou de ser considerada uma doença essencialmente ocupacional passando a ser identificada com uma enfermidade transmitida através da alimentação. A difusão da brucelose dos animais para o homem foi apresentada como fonte de infecção os animais abatidos em matadouros e/ou subprodutos da carne ou carne mal cozida de animais brucélicos (DIMITROV *et. al.*, 2004).

As fontes de infecções mais frequentes são a ingestão de leites crus de animais infectados e derivados, em especial queijos frescos. O hábito de se ingerir leite cru, difundido em todo país, é de grande preocupação diante da contaminação direta com o agente, por isso as indústrias tem ganhado mercado no processo de pasteurização que reduz o risco de infecção com a produção de leite processado (VERONESI e FOCACCIA, 2009). O risco de contrair brucelose pela ingestão de carne bovina é extremamente baixo, pois normalmente as bactérias não são encontradas nos músculos desses animais e morrem quando submetidas às temperaturas utilizadas na culinária tradicional (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

Outras fontes de infecções são legumes crus contaminados por excrementos de animais contaminados, irrigados com água ou adubados com esterco de animal brucélicos, as vísceras, medula espinhal e gânglios linfáticos de animais infectados, em que a *Brucella Abortus* pode permanecer viável após abate por mais de um mês. E este tempo se prolonga para os alimentos congelados e

resfriados, águas de cisternas e poços contaminados por excrementos de animais doentes (GEISHOFER, 2008). A sobrevivência de *Brucella* spp. no ambiente é ampliada pela presença de umidade e, quanto maior a sobrevivência no ambiente, maior é a chance desse agente infectar um novo suscetível. Assim, a presença de áreas alagadiças na propriedade pode favorecer a difusão da doença (ALVES *et. al.*, 2009).

Os animais infectados com a Brucelose são os reservatórios dessa enfermidade, as espécies animais responsáveis pela contaminação do humano são aquelas com quem tem contato como gado, ovelhas, cabras e porcos. Outras, incluindo camelos, cães, cavalos, búfalos são consideradas menos relevantes, embora possam ser reservatório importante em regiões específicas em função da cultura, hábitos, costumes e condições sanitárias. Recentemente, o isolamento da bactéria em animais marinhos alertou para este novo reservatório (WHO, 2013).

A brucelose humana é uma doença sistêmica que pode comprometer qualquer órgão ou sistema de forma subaguda, aguda ou crônica. A doença apresenta diversas formas clínicas, dependentes da espécie, do modo de transmissão e também da resposta do hospedeiro. Embora em humanos a doença seja caracterizada como inespecífica, é descrita uma tríade de sintomas que caracteriza a doença: Febre superior a 38°C, pode se apresentar de forma remitente, intermitente, irregular ou ondulante, apresenta acentuação vespertina, prolongando-se durante a noite, com período de remissão matinal; Sudorese profusa, predominantemente noturna, com cheiro desagradável; Dor,

artralgia de pequenas e grandes articulações, mialgia e cefaleia (PELERITO *et. al.*, 2014; SANTA CATARINA, 2013).

Várias espécies domésticas ou silvestres são suscetíveis à infecção por *B. abortus*, entretanto, são consideradas como hospedeiros finais da infecção, pois não transmitem o agente novamente aos bovinos. Entre aquelas espécies em condições de ter alguma importância na epidemiologia da brucelose bovina, podem ser citados: os equídeos, que podem apresentar lesões articulares abertas, e principalmente lesões de cernelha; os cães, que podem abortar pela infecção; e os saprófagos, pela possibilidade de levar restos de placenta ou feto de um lugar para outro. (BRASIL, 2006)

Uma forma considerável de introdução de brucelose nas propriedades é a introdução de novos animais oriundos de áreas de risco desconhecidos ou comprovadamente positiva, quanto maior a frequência de introdução de animais, maior o risco de entrada da doença no rebanho, alguns outros fatores relacionados ao tamanho do rebanho, ausência ou baixa taxa de vacinação, alta densidade de alguns rebanhos e a demora na eliminação dos animais infectados propicia a maior transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (IDAF, 2013).

### 3.5 PATOGÊNESE

Para os bovinos, as fontes mais comuns de contaminação são os fetos abortados, os envoltórios fetais, as descargas vaginais de fêmeas infectadas, a água, os alimentos e fômites contaminados. O útero gravídico concentra uma grande quantidade de microrganismos que são eliminados durante o parto ou abortamento e todo o puerpério junto com as secreções uterinas e membranas fetais, além do leite e do sêmen (ALMEIDA, 2009).

A porta de entrada da infecção mais importante é o trato digestivo, sendo iniciada quando o animal ingere água e alimentos contaminados ou pelo hábito de lambe as crias recém nascidas. A *Brucella Abortus* penetra no organismo pela mucosa oral nasofaringe, conjuntival ou genital e pele intacta (BRASIL, 2006; MONTEIRO *et. al.*, 2006).

A *Brucella* tem predileção para útero gravídico e esse se deve pela secreção do eritritol, que só é secretado em algumas espécies como em bovinos, caprinos, ovinos, suínos e cães. O eritritol atrai a *Brucella* e funciona como fator estimulante para o seu crescimento. Essa substância não é produzida pela mulher ou pela égua que, por conseguinte, não apresentam abortamento em consequência da brucelose, no macho esse tropismo ocorre pelos testículos (SOUZA, 2013; GARCIA E MARTINS, 2013).

A infecção do útero gestante ocorre por via hematogênica. As *Brucellas* ssp. multiplicam-se inicialmente e no trofoblasto do placentoma, infectando também

as células adjacentes, levando a uma reação inflamatória da placenta. Além disso, há infecção do feto, de igual modo por via hematogênica. As lesões placentárias raramente atingem todos os placentomas, em geral, apenas parte deles é afetada. Tais lesões inflamatório-necróticas de placentomas, que impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, assim como provocam a infecção maciça do feto por *B. abortus*, são as responsáveis pelo aborto (BRASIL, 2006)

Na gestação subsequente à infecção ocorre o aborto próximo do 5º ou 6º mês, na segunda gestação pode ocorrer ao redor do sétimo mês e um terceiro eventual aborto sendo este mais raro por volta do oitavo mês porque a imunidade protetora se instala completamente por volta do período correspondente ao terceiro aborto. A partir de então, as gestações seguem normalmente e os bezerros nascem a termo (MOLINA, 2013).

### **3.6 SINAIS CLÍNICOS**

Além dos problemas causados à saúde pública, a brucelose também gera prejuízos econômicos ao tornar o produto animal vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). Os principais sinais clínicos relativos à brucelose nos animais são relacionados com a esfera reprodutiva. Nas fêmeas, podem ocorrer abortos, que se concentram no terço final da gestação, não

sendo observada nenhuma lesão patognomônica da brucelose, mas é relatado o estado de autólise do feto, e comumente é observada uma broncopneumonia supurativa. Outras manifestações são o nascimento de prematuros com baixo peso, esterilidade e baixa produção de leite, já nos machos, existe uma fase inflamatória aguda, seguida de uma outra fase crônica, frequentemente assintomática. As bactérias podem instalar-se nos testículos, epidídimos e vesículas seminais. Um dos possíveis sinais é a orquite uni ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume dos testículos. Em outros casos, o testículo pode apresentar um aspecto amolecido e cheio de pus, além de lesões articulares como artrite nos tarso e metatarso ou poliartrite, tenosinovite, bursites e abscessos cutâneos, podem ser observadas higromas e bursite de cernelha (BRASIL, 2006; ALMEIDA, 2000; MOLINA, 2013, FERREIA *et. al.*, 2013).

Outra sintomatologia relacionada é a retenção de placenta, que esta parece estar relacionada à inibição direta ou indireta da apoptose, causada pela inflamação e infecção brucélica, levando ao retardo da liberação e da maturação da placenta acarretando na sua retenção (MEÇA *et. al.*, 2006). A infecção congênita pode ocorrer *in útero*, filhas de vacas brucélicas contaminadas desta forma podem apresentar sorologia negativa para *Brucella abortus*, até que ocorra o primeiro parto ou aborto (RADOSTITS *et. al.*, 2007).

Pelos motivos expostos o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA (BRASIL, 1952) determina no seu artigo 116, que é proibida a matança em comum de animais que no ato de inspeção

"ante-mortem", sejam suspeitos de uma série de zoonoses, dentre elas a brucelose, voltando a tratar da enfermidade no artigo 163 do referido regulamento em que determina que devam ser condenadas as carcaças com lesões extensas de brucelose, e no seu parágrafo único - Nos casos de lesões localizadas encaminham-se as carcaças à esterilização pelo calor, depois de removidas e condenadas as partes atingidas.

Almeida e colaboradores (2000) relatam que no exame ante-mortem as lesões sugestivas de brucelose, como as bursites da cernelha, são de difícil visualização, sendo de pouco valor a tentativa de separar os animais suspeitos, e que a sua associação com a sorologia não é satisfatória.

O artigo 183 do RIISPOA (BRASIL, 1952) dispõe que "Glândulas mamárias - As glândulas mamárias devem ser removidas intactas", no inciso 3º traz a informação que "As glândulas mamárias portadoras de mastite, bem como as de animais reagentes à brucelose, são sempre condenadas."

Na produção leiteira o referido regulamento, traz mais determinações no artigo 485:

A D.I.P.O.A. e a D.D.S.A entrarão em entendimento a fim de pôr em execução um plano para erradicação da tuberculose, da brucelose ou de quaisquer outras doenças dos animais produtores de leite.

Parágrafo único - os animais suspeitos ou atacados de tuberculose ou brucelose devem ser sumariamente afastados da produção leiteira.

### **3.7. ACHADOS DE NECROPSIA**

Segundo o Manual do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) os materiais de escolha são aqueles do sistema retículoendotelial, sendo os linfonodos mais importantes os supramamários, os parotídeos, os retrofaríngeos, os ilíacos internos e os préescapulares, além deles, o baço, todos em ambos os sexos. Os cotilédones, o útero e o úbere são também importantes nas fêmeas, já nos machos, são também importantes os testículos, a próstata, os epidídimos e as vesículas seminais, sendo que esse material teve ser remetido para exame histopatológico, fragmentos em torno de 0,5 cm x 1,0 cm x 1,0 cm devem ser fixados em um volume 50 vezes maior de formol a 10% e enviados ao laboratório à temperatura ambiente (BRASIL, 2006).

Não há nenhuma lesão considerada patognomônica da doença, porém no feto abortado, pode ocorrer com frequência pleurite fibrinosa, que pode estar associada à broncopneumonia supurativa e pericardite fibrinosa. Outro tipo de lesão que pode esta associada à brucelose bovina é a necrose de cotilédones e edema na área intercotiledonária, lesões placentárias podem estar distribuídas aleatoriamente entre os placentomas. Microscopicamente, a lesão mais frequente é a placentite necrótica, caracterizada por necrose superficial ou profunda das carúnculas, associada à hemorragia, exsudato neutrofílico e colônias bacterianas intralesionais. Nos machos as lesões são hemorragia e focos de necrose nas vesículas seminais que evoluem com hipertrofia e

endurecimento do cordão espermático em consequência à proliferação de tecido conjuntivo. Nos casos de evolução crônica os testículos e epidídimo podem estar aumentados de volume devido à proliferação de tecido conjuntivo (XAVIER, 2009).

### **3.8. DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser realizado de forma direta com o isolamento e identificação do micro-organismo ou indireta com o acompanhamento da resposta imunológica do animal via sorologia.

#### **3.8.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

Os sinais clínicos da doença são inespecíficos não caracterizando a doença, episódios de aborto em novilhas de primeira cria ou em animais de reposição são sugestivos, porém não sendo a brucelose a única causa de abortos infecciosos nas propriedades, por isso essa modalidade de diagnóstico para brucelose não é eficaz (QUINN *et. al.*, 2011; RADOSTISTIS *et. al.*2007),

### **3.8.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

O principal objetivo no diagnóstico laboratorial da brucelose é identificar os animais que estão infectados e os que abrigam o micro-organismo e disseminam a enfermidade. Os testes laboratoriais usados no diagnóstico da brucelose incluem o isolamento e identificação do micro-organismo, os diagnósticos imunológicos e sorológicos que detectam anticorpos anti *Brucella Abortus*, no soro, leite, no muco vaginal e plasma seminal (BRASIL, 2006; RADOSTITIS *et. al.*, 2007).

#### **3.8.2.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**

O isolamento de *Brucella* é prova definitiva de que o animal é infectado, mas nem todos os animais infectados apresentam positivo para uma cultura, o diagnóstico laboratorial envolve alguns riscos, pois o agente pode estar presente em fluídos orgânicos do animal como sangue, leite, por isso recomenda-se classes de risco biológico 3, que prevê Risco individual elevado e risco comunitário limitado.

A exposição pode causar doenças graves ao homem podendo propagar-se de uma pessoa infectada para outra, entretanto existe profilaxia e/ou tratamento. Diante disto, esses laboratórios devem ter barreiras de proteção individual e

toda manipulação realizada em cabine de segurança biológica classe II ou III, com filtro HEPA, com treinamento específico aos funcionários no manejo de agentes patogênicos e potencialmente letais (WHO, 2013; BRASIL, 2013).

O isolamento e a identificação da *B. abortus* a partir de material de aborto (feto, conteúdo estomacal de feto, placenta) ou de secreções apresentam resultados muito bons se a colheita e o transporte da amostra forem bem realizados e se a amostra for processada para o isolamento da *Brucella* spp. utilizam-se meios de cultura ágar cérebro coração (BHI) e ágar *Brucella*, suplementados com os antibióticos: vancomicina (20 mg/L), anfotericina B (1 mg/L) e o antimicrobiano violeta de genciana (1:100.000). Emprega-se também no isolamento o meio bifásico composto por BHA e caldo cérebro coração (BHI), suplementado com os referidos antibióticos e antimicrobiano, incubadas a 37° C em microaerofilia (5% a 10% de CO<sub>2</sub>) e em aerobiose, por 3 a 5 dias e com observação diária dos meios inoculados e em laboratórios de referência para realização do procedimento de identificação (FREITAS e OLIVEIRA, 2005; BRASIL, 2006; OIE, 2014b).

As provas bioquímicas são as de catalase, oxidase, uréase, citrato e redução de nitrato. A confirmação das espécies e das biovariedades de *Brucella* spp. podem ser determinadas pelas provas de crescimento em atmosfera de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, teste de aglutinação com acriflavina, produção de H<sub>2</sub>S, crescimento na presença de tionina e fucsina básica e aglutinação frente a soros anti-A, anti-M e anti-R (ALTON *et. al.*, 2013).

### 3.8.2.2. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Os métodos indiretos ou sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose constituem-se em um importante recurso utilizado no programa de controle e erradicação da brucelose bovina. O PNCEBT definiu como oficiais os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste de Anel em Leite (TAL), como provas de triagem, e como testes confirmatórios estabeleceu o teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT), e a reação de Fixação do Complemento (FC) para detecção de antígenos pelo emprego de anticorpos específicos, com o objetivo de detectar uma exposição prévia do animal ao agente. Alguns outros testes, como o Teste de ELISA Indireto (I-ELISA), Teste de ELISA Competitivo (C-ELISA) e Teste de Polarização de Fluorescência (FPA), são contemplados no PNCETB (BRASIL, 2006; MATHIAS, MEIRELLES e BUCHALA, 2007).

Para Poester *et. al.*, (2005) os testes sorológicos detectam os anticorpos contra *Brucella* spp. presentes em diversos fluídos corporais como soro sanguíneo, muco vaginal, sêmen e leite, a escolha de um método sorológico deve-se levar em consideração o tamanho e as características da população a ser analisada, a situação epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes e principalmente se há utilização de vacinas.

Esses testes sorológicos empregados para o diagnóstico da brucelose identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais

infectados, baseando-se em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (ALTON *et. al.*, 2013; RAJASHEKARA *et. al.*, 2013; MINHARRO, 2014).

Para o PNCETB os animais só devem ser testados com 24 meses, pois alguns dos testes podem ocorrer reações inespecíficas ou falso-positivas provenientes de animais vacinados contra a brucelose, essa reação pode está envolvendo imunoglobulinas da classe IgM, que devem ser avaliadas em seu contexto (ALTON *et. al.*, 1988; MINHARRO, 2014; WHO, 2013).

#### **3.8.2.2.1. DIAGNÓSTICO AGLUTINAÇÃO**

Os testes de soro aglutinação para *Brucella Abortus* são divididos em duas classes: as de soro aglutinação rápida, que compreende o teste do rosa bengala e a de soro aglutinação lenta: sendo representadas pelo teste de soro aglutinação lenta em tubos SAL, todas duas técnicas estão relacionadas com a observação de interação do antígeno com anticorpos aglutinantes. Esse tipo de diagnóstico é tido como simples, rápido, preciso e tem uma boa sensibilidade, é considerado, inicialmente, como teste de triagem em rebanhos no caso da prova rápida e como confirmatório na prova do SAL (BRASIL, 2006; RADOSTITIS *et. al.*, 2007; WHO, 2013).

A prova do antígeno acidificado tamponado foi desenvolvida a partir da observação de que a IgG 1 bovina é menos ativa em pH 7, mudando de comportamento com a acidificação do meio, é uma prova de característica qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado e sim a presença ou ausência do anticorpo IgG 1 no soro testado, ela é indicada e considerada a melhor alternativa para o diagnóstico de rebanhos (RADOSTITIS *et. al.*, 2007).

Nas provas clássicas de aglutinação, reagem tanto anticorpos IgM como IgG, como o antígeno é preparado na concentração de 8% tamponado em pH ácido (3,75), o que aumenta o poder de aglutinação da IgG 1 e reduz a reatividade da IgM e é corado com rosa Bengala. Este processo de inativação de IgM se trata de um processo físico, é provável que nem todas a IgM tenham sua reatividade reduzida, nessa perspectiva a não detecção da IgM em fases iniciais da infecção não é tão importante porque, embora a IgM seja o primeiro anticorpo produzido, as IgGs são logo após (WRIGHT e NIELSEN, 1990; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

A prova de soro aglutinação lenta em tubos é a mais antiga para o diagnóstico da brucelose, datando de 1897, ainda sendo uma prova de grande importância no diagnóstico desta enfermidade, é utilizado um antígeno que apresenta concentração de massa bacteriana de 4,5%, sem corante, padronizado a partir da cepa 119-3 de *Brucella Abortus*, inativado pelo calor, esse antígeno deve ser produzido com cepas lisas, pois essas têm uma estabilidade maior frente às rugosas no que diz respeito a características aglutinogênicas. O resultado da

aglutinação da prova do SAL pode ser lido como completa, com formação de grumos evidentes, incompleta com presença de grumos finos ou negativo com ausência de grumos (WHO, 2013). Outra técnica que pode ser utilizada é a imunofluorescência, pode ser direta ou indireta.

### **3.8.2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E INDIRETA**

Na imunofluorescência direta é possível detectar o antígeno pesquisado propriamente dito, coloca-se a amostra a ser analisada numa placa específica para fluorescência, a seguir, adiciona-se o conjugado (anticorpo específico marcado com fluorocromo); já imunofluorescência indireta a placa de fluorescência já vem com antígenos específicos, testa-se o soro do paciente e depois adiciona-se um anti-anticorpo marcado com fluorocromo (NAOUM, 2014).

A imunofluorescência indireta (IFI) tem particular interesse no diagnóstico sorológico da brucelose. Tem a vantagem de não se dirigir a uma determinada imunoglobulina, não dependendo o resultado do momento em que empregamos o método, bem como apresentar menos reações cruzadas e positivar mesmo na presença de anticorpos bloqueantes. A IFI é o meio de diagnóstico mais frequentemente positivo na brucelose crônica e foi desenvolvido para corrigir as deficiências do teste de aglutinação. (PESSEGUEIRO *et. al.* 2003).

#### 3.8.2.4. IMUNOENSAIOS

Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas, nesta perspectiva a prova que é preconizada pelo PNCETB, é a prova de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), que pode ser indireta ou competitiva, é considerada uma prova rápida, porém, assim como o AAT, este teste possui alta sensibilidade e especificidade menor, por isso muitas reações falso positivas podem ocorrer (BRASIL, 2006; PUTINI *et. al.*, 2008).

O ELISA indireto (iELISA) não é encontrado facilmente no comércio brasileiro, por não ser recomendado como teste oficial. Nesse método, uma enzima, que reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido, é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação. Então, a presença de produto colorido indica a presença de antígeno. Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas ( $10^{-9}$  g).

No ELISA, deve-se selecionar um par de anticorpos, que podem ser monoclonais ou policlonais. O uso de anticorpos monoclonais resulta em maior especificidade (GOLDSBY *et. al.*, 2012).

No ELISA indireto, muitos protocolos têm sido empregados, com bons resultados, emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo (LPS) de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina ou caprina conjugado com a peroxidase. Agentes quelantes (EDTA/EGTA) são utilizados para minimizar reações não específicas. O teste possui alta sensibilidade; entretanto, sua especificidade assemelha-se àquela do AAT (PUTINI *et. al.*, 2008).

No teste do ELISA competitivo, utiliza-se também como antígeno imobilizado na fase sólida o LPS de *B. abortus*. No momento da prova, o soro a ser testado é misturado com um anticorpo monoclonal específico contra a cadeia "O" de *B. abortus*. Um conjugado peroxidase-anti-IgG é utilizado para detectar o anticorpo monoclonal ligado ao antígeno imobilizado na fase sólida do teste. Quanto maior a quantidade de anticorpos anticadeia "O" de *Brucella spp.* no soro testado, maior a competição com o anticorpo monoclonal específico e menor a quantidade de cor desenvolvida. É um teste muito sensível e específico, e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose (BRASIL, 2006).

Embora seja considerada uma técnica simples ela depende de mão de obra treinada ou a utilização de kits comerciais para sua eficácia. Em princípio o ELISA possa ser usado para os testes de soro a partir de todas as espécies de animais, os resultados podem variar entre laboratórios dependendo da metodologia exata usada (WHO, 2013). O problema da utilização deste teste surge com a pouca experiência clínica que existe em correlacionar os resultados

com a clinica, alguns autores tem sugerido a realização do ELISA como prova única de diagnostico, pela sua alta sensibilidade para busca de anticorpo (ANDRADE e MORERA, 2014).

### **3.8.2.5 TÉCNICAS MOLECULARES**

Atualmente, técnicas moleculares têm sido empregadas para o diagnóstico de várias enfermidades, ocorrendo da mesma forma com a brucelose bovina, devido a sua alta sensibilidade e especificidade tem se obtido resultados satisfatórios. De uma maneira geral essa prova permite a detecção ou ausência de material genético específico da bactéria na presença ou ausência de anticorpos em soro de animais suspeitos (ANDRADE e MORERA, 2014).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* deste DNA de forma extremamente rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas. Este processo decorre em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete um número específico de vezes (KIRINUS *et. al.*, 2014).

### **3.9. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO**

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou, em 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o intuito de melhorar a eficácia de medidas de controle dessas duas doenças, a fim de promover a qualidade dos produtos de origem animal oferecidos ao consumidor e modernizar as cadeias produtivas do leite e da carne.

Antes de 2001, o controle da brucelose era regido pela Portaria nº 23 do Ministério da Agricultura de 1976, e dependia principalmente de iniciativas individuais, não obtendo resultados esperados.

Em 2001, foi lançado no país o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Tuberculose e da Brucelose – PNCEBT, o qual permite que se caracterizem as propriedades como livres e monitoradas para tais doenças. O PNCEBT objetiva diminuir a prevalência da doença, combinando estratégias compulsórias que atinjam toda a população bovina, com medidas seletivas de adesão voluntária. Segundo o PNCEBT o controle da brucelose apoia-se basicamente em ações de vacinação massal de fêmeas, diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. (BRASIL, 2006; CAMPOS *et. al.*, 2008).

Além da fiscalização realizada pelo MAPA e pelas agências de defesa agropecuárias dos estados, com o advento do PNCEBT, algumas medidas foram implementadas para o controle da brucelose bovina. Uma das medidas de

controle, preconizadas pelo PNCEBT, está relacionada com a vacinação das fêmeas de três a oito meses, com vacinas atenuadas, as quais são utilizadas nos programas de controle da brucelose, sendo duas delas recomendadas e empregadas atualmente pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

São utilizadas as vacinas B19 em fêmeas de 03 a 08 meses de idade e em fêmeas adultas que não tenham sido vacinadas até os 08 meses com a B19, com a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51, ambas são boas indutoras de imunidade celular, com esta ação, objetiva-se reduzir consideravelmente a prevalência da brucelose bovina. Já em propriedades certificadas como livres da brucelose bovina, recomenda-se que as bezerras sejam vacinadas até 06 meses de idade, de forma a minimizar a possibilidade de reações vacinais nos testes de diagnóstico (BRASIL, 2006; BASTOS *et. al.* 2012).

Os procedimentos de certificação e monitoramento de propriedades livres de brucelose e de tuberculose obedecem aos princípios técnicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), e, portanto, acreditados e aceitos internacionalmente. Os testes nestas propriedades são feitos em todo o rebanho, sacrificando os animais reagentes aos testes, e o *status* é concedido à propriedade que não registre nenhum animal positivo em três resultados, no período mínimo de nove meses. Terminado o período de testes a propriedade é condicionada à manutenção por meio do cumprimento de todas as regras e normas sanitárias estabelecidas (BRASIL, 2014).

Unido às estratégias de fiscalização, vacinação e monitoramento, está relacionada a capacitação de médicos veterinários oficiais ou autônomos, para a realização dos testes e vacinação dos animais e padronização dos exames por estes realizados, hoje o PNCEBT preconiza a realização de exames laboratoriais para o diagnóstico da brucelose bovina, como provas de triagem o antígeno acidificado tamponado (AAT) e o anel do leite, e confirmatório 2Mercaptoetanol (2-ME), Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT), teste de fixação de complemento (FC), Teste de ELISA Indireto (I-ELISA), Teste de ELISA Competitivo (C-ELISA) e Teste de Polarização de Fluorescência (FPA) (BRASIL, 2006).

## **CAPÍTULO I**

## **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

### **Diagnóstico de Brucelose pela técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos contra *Brucella abortus* em soro de bovinos**

*(Diagnosis of brucellosis by indirect ELISA technique for the detection of antibody to Brucella abortus in bovine serum.)*

Marcus Paulo de Matos Maturino<sup>1</sup>, Vinicius Pereira Vieira<sup>3</sup>, Juliana Lira Gama Pires Alves<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos<sup>3</sup>, Robson Bahia Cerqueira<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Mestrando no programa de pós graduação em Defesa Agropecuária da UFRB, <sup>2</sup>Graduandos em Medicina Veterinária Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), <sup>3</sup>Professor Adjunto Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

## **Diagnóstico de Brucelose pela técnica do ELISA indireto na detecção de anticorpos contra *Brucella abortus* em soro de bovinos**

*(Diagnosis of brucellosis by indirect ELISA technique for the detection of antibody to Brucella abortus in bovine serum.)*

Marcus Paulo de Matos Maturino<sup>1\*</sup>, Vinicius Pereira Vieira<sup>3</sup>, Juliana Lira Gama Pires Alves<sup>3</sup>, Carlos Ramos<sup>4</sup>, Robson Bahia Cerqueira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Médico Veterinário Mestrando no programa de pós graduação em Defesa Agropecuária da UFRB, <sup>2</sup> Professor Doutor adjunto da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), <sup>3</sup> Graduando em Medicina Veterinária Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), \*Rua Manoel Vilaboim, nº 09, Centro, Cruz das Almas – Bahia CEP 44380-000 [mpmaturnio@yahoo.com.br](mailto:mpmaturnio@yahoo.com.br).

### RESUMO

A brucelose bovina é considerada uma doença de evolução crônica, as fêmeas gestantes são a principal fonte de infecção e disseminação da doença, principalmente pelos conteúdos abortados. As bactérias do gênero *brucella* podem ser classificadas em lisas ou rugosas, dependendo da presença ou ausência da cadeia de polissacarídeo O na molécula de lipopolissacarídeo (LPS). O presente trabalho apresenta como objetivo padronizar um teste imunoenzimático para diagnóstico da brucelose bovina, utilizando antígenos denominados liso e rugoso. Foram utilizados 30 soros de bovinos confirmados positivos e 30 de bovinos negativamente confirmados para brucelose bovina, ambos foram submetidos ao ELISA indireto com a utilização de dois antígenos produzidos a partir de cepas de *brucella* rugosas e lisas. O ponto de corte do Elisa liso foi de 0,223 e o do Elisa rugoso foi de 0,181, a sensibilidade foi de 33,33% e 23,33% e especificidade foi de 86,66% e 100%, nos antígenos liso e rugoso, respectivamente. Esses valores sugerem a utilização do ELISA indireto como prova de triagem para brucelose bovina, já que o mesmo demonstra a capacidade de diagnosticar animais naturalmente infectados de não infectados.

## ABSTRACT

Bovine brucellosis is considered a disease of chronic evolution, pregnant females are the main source of infection and spread of disease, especially the aborted content. Bacteria of the genus *Brucella* can be classified into smooth or rough, depending on the presence or absence of chain The polysaccharide molecule in the lipopolysaccharide (LPS). This paper presents objective was to standardize a test, using smooth and imuoenzimatico own juices called antigens. 30 confirmadso positive bovine sera and 30 negative cattle were confirmed used, both were subjected to ELISA with use of two antigens produced from smooth and rough strains of *Brucella*. The cutoff smooth Elisa was 0.223 and the rough Elisa was 0.181, sensitivity was 33.33% and 23.33% and specificity was 86.66% and 100%, in smooth and rough antigens respectively . These values suggest the use of indirect ELISA as a screening test for bovine brucellosis, since it demonstrates the ability to diagnose naturally infected animals from uninfected.

## INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infecto-contagiosa, de evolução crônica provocada por bactérias do gênero *Brucella* (BRASIL, 2006). Os bovinos representam as fontes mais comuns de infecção principalmente às fêmeas gestantes que abortam. Os fetos abortados, os envoltórios fetais, as descargas vaginais de fêmeas infectadas, a água, os alimentos e fômites contaminados têm sido causa de disseminação. O útero gravídico concentra uma grande quantidade de microorganismos que são eliminados durante o parto ou abortamento e todo o puerpério junto com as secreções uterinas e membranas fetais, além do leite e do sêmen (ALMEIDA, 2009).

Um número substancial de componentes antigênicos da *Brucella abortus* foram caracterizados, dentre eles os componentes estruturais dos lipopolissacáridos da parede celular da bactéria são responsáveis por desencadear uma resposta humoral no hospedeiro. As bactérias deste gênero podem ser classificadas em lisas ou rugosas, dependendo da presença ou ausência da cadeia de polissacarídeo O na molécula de lipopolissacarídeo (LPS), essa cadeia é um homopolímero de N-formil-perosamina (GODFROID et. al., 1998; SIADAT et. al., 2013; ANTUNES e MEGID, 2013).

A maioria das imunoglobulinas presentes no soro de bovinos pertencem ao isotipo IgG (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) (BRASIL, 2006). A resposta humoral de bovinos infectados por *B. abortus*, caracteriza-se

pela síntese dos quatro isotipos principais de imunoglobulinas. A resposta sorológica pós-infecção ou vacinação, se dá a partir da primeira semana, ocorrendo inicialmente, o surgimento do isotipo IgM menos específicos, sendo seguido pelo IgG1, sendo que este supera os títulos do IgM e permanecendo como anticorpos dominantes na infecção, estes anticorpos aglutinantes não possuem atividade opsonizante e nenhum efeito sobre a eliminação do organismo (GOMES, 2013).

Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas, a prova de ELISA (Enzyme-linkedimmunosorbentassay), que pode ser indireta ou competitiva, é considerada uma prova rápida, este teste possui alta sensibilidade e especificidade menor, por isso muitas reações falso positivas podem ocorrer (BRASIL, 2006; PUTINI *et. al.*, 2008). O presente trabalho apresenta como objetivo padronizar um teste imunoenzimático para diagnóstico da brucelose bovina, utilizando antígenos denominados liso e rugoso.

## **MATERIAL E MÉTODO**

Foram utilizadas 60 amostras de soros de bovinos, pertencentes ao banco de soro do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, os soros considerados positivos

são compostos de, 25 fêmeas e 05 machos, naturalmente infectados e confirmados positivos para brucelose bovina pelas provas nas provas preconizadas pelo programa de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT) e 30 soros considerados negativos compostos de 25 fêmeas e 05 machos, de animais comprovadamente negativos nas provas preconizadas pelo PNCEBT. Os animais positivos apresentam histórico de aborto no caso das fêmeas e epididimite nos machos.

Para análise das mostras com o antígeno liso, foi utilizado um antígeno comercial produzido a partir de uma cepa de *Brucella abortus* 1119/3 inativada pelo calor, diluído em tampão Carbonato Bicarbonato 0,05 M; pH 9,6, para sensibilização da placa. Com uma micropipeta foi acrescentado 100µl do antígeno diluído em cada poço da placa ELISA de micropoços de poliestireno, com 96 poços e conduzido em câmara úmida e levada *over night* à temperatura entre 4 e 8°C.

Depois de retirada da geladeira a placa foi lavada duas vezes com PBS-T e foi iniciado o bloqueio com leite desnatado a 5%, acrescentando 200µl por poço da placa, que foi levada dentro de uma câmara úmida para estufa a 37°C, por duas horas. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada, uma vez com PBS-T. Procedeu-se à diluição do soro seguindo o seguinte protocolo: foram colocados 33 ependorfs, devidamente identificados na galeria e após diluição do leite desnatado a 1% em 50ml de PBS-T foi colocado 1ml dessa diluição em cada ependorf. Acrescentou-se em seguida 10µl de cada soro conforme mapa de identificação, num total de 30 amostras, após isso foi retirado 50µl dessa diluição e colocado duplicata em cada poço da placa que foi levada para estufa

a 37°C por 1 hora. Depois de retirada da estufa a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T, em seguida foi diluído 10µl do conjugado anti-IgG bovina em 10ml de PBS-T em diluição 10:10.000, colocado 50µl dessa diluição em cada poço da placa que foi levada para estufa a 37°C por uma hora, após isso a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T. Preparou-se a solução reveladora, na qual diluiu-se 4µl de água oxigenada, 4mg de OPD em 10ml de tampão cítrico pH 5,1. Acrescentou-se 50µl dessa diluição em cada poço da placa que foi guardada sem exposição da luz para revelação entre 15 e 20 minutos. Após esse tempo, a reação foi freada com ácido sulfúrico 4N e realizou-se a leitura da placa em filtro de 490nm.

No procedimento do ELISA indireto com o antígeno rugoso, foi utilizado um antígeno comercial produzido a partir de uma cepa de *Brucella abortus* tratada com doses de Rinfampacina, denominada de antígeno rugoso, foi diluído em tampão Carbonato Bicarbonato 0,05 M pH 9,6 para sensibilização da placa, com uma micropipeta foi acrescentado 50µl do antígeno diluído em cada poço da placa ELISA de micropoços de poliestireno, com 96 poços e colocado em câmara úmida e levada *over night* à temperatura entre 4 e 8°C. Depois de retirada da geladeira a placa foi lavada duas vezes com PBS-T e foi iniciado o bloqueio com leite desnatado a 5%, acrescentando 100µl por poço da placa, que foi levada dentro de uma câmara úmida para estufa a 37°C, por duas horas. Depois de retirada da estufa, a placa foi lavada, uma vez com PBS-T.

Procedeu-se à diluição do soro seguindo o seguinte protocolo: foram colocados 33 endorfs devidamente identificados na galeria e após diluição do leite desnatado a 1% em 50ml de PBS-T foi colocado 1ml dessa diluição em cada

ependorf. Acrescentou-se em seguida 10µl de cada soro conforme mapa de identificação, num total de 30 amostras, após isso foi retirado 50µl dessa diluição e colocado duplicata em cada poço da placa que foi levada para estufa a 37°C por 1 hora. Depois de retirada da estufa a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T, em seguida foi diluído 10µl do conjugado anti-IgG bovina em 10ml de PBS-T em diluição 10:10.000, colocado 50µl dessa diluição em cada poço da placa que foi levada para estufa a 37°C por uma hora, após isso a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T.

Preparou-se a solução reveladora, na qual diluiu-se 4µl de água oxigenada, 4mg de OPD em 10ml de tampão cítrico pH 5,1. Acrescentou-se 50µl dessa diluição em cada poço da placa que foi guardada sem exposição da luz para revelação entre 15 e 20 minutos. Após esse tempo, a reação foi freada com ácido sulfúrico 4N e realizar-se-á a leitura da placa em filtro de 490nm.

## **ESTUDO ESTATÍSTICO**

O "cut-off" foi calculado por meio da média da Densidade Ótica dos animais não reagentes + 3desvio padrão (FREY *et. al.*, 1998). A concordância entre os dois testes foi calculada por meio da fórmula citada por MATHIAS *et. al.* (1998).

$$\frac{\text{Positivo em ambos os testes} + \text{Negativos em ambos os testes}}{\text{Total de soros testados}} \times 100$$

## **DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE**

A fórmula utilizada foi baseada no estudo de Mathias *et. al.* (1998) conforme representação abaixo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Doentes detectados pelo teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Sãos negativos ao teste}}{\text{Total de são testados}} \cdot 100$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cálculos realizados com valores de densidade óptica dos soros dos animais não reagentes para determinação do ponto de corte constatou valor de 0,223 na prova realizada com o antígeno liso, no teste que utilizou o antígeno rugoso o valor do ponto de corte foi de 0,181. Os valores de ponto de corte encontrados no presente estudo divergem dos valores de Putini (2008) que encontrou valor de "cut-off" 0,122 e dos valores de Paweska (2002) 0,02, esses valores são influenciados diretamente pelos valores de absorbância dependendo da titulação do soro dos animais analisados. Tais valores de absorbância obtidos com o teste do ELISA indireto, utilizando o antígeno liso nas amostras de soro bovino, que apresentavam sinais clínicos da doença variavam aproximadamente entre 0,127 e 0,387 (figura 1). Nas amostras

comprovadamente negativas, submetidos ao mesmo antígeno, verificaram-se valores de absorvância variáveis aproximadamente entre 0,105 e 0,266 (figura 2).

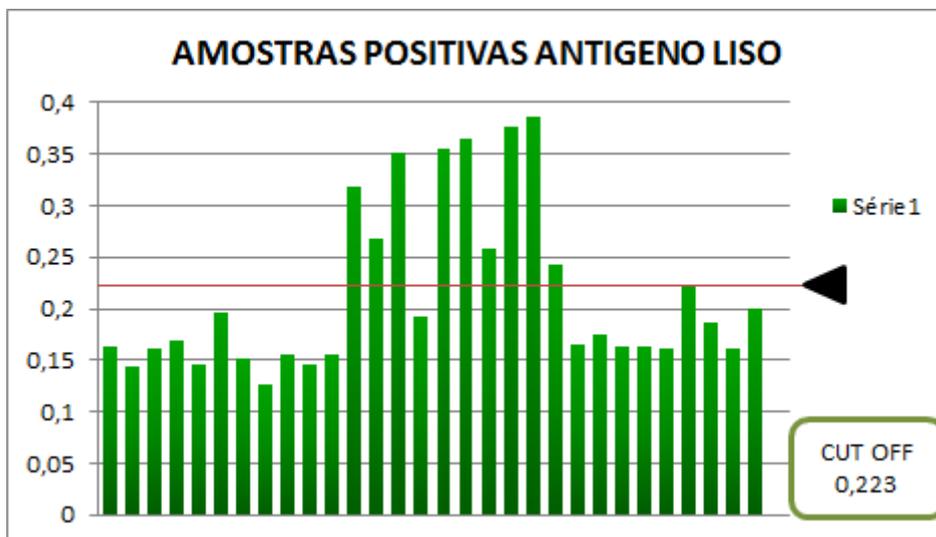


Figura 1 Valores de absorvância de soro de bovinos confirmados positivos.

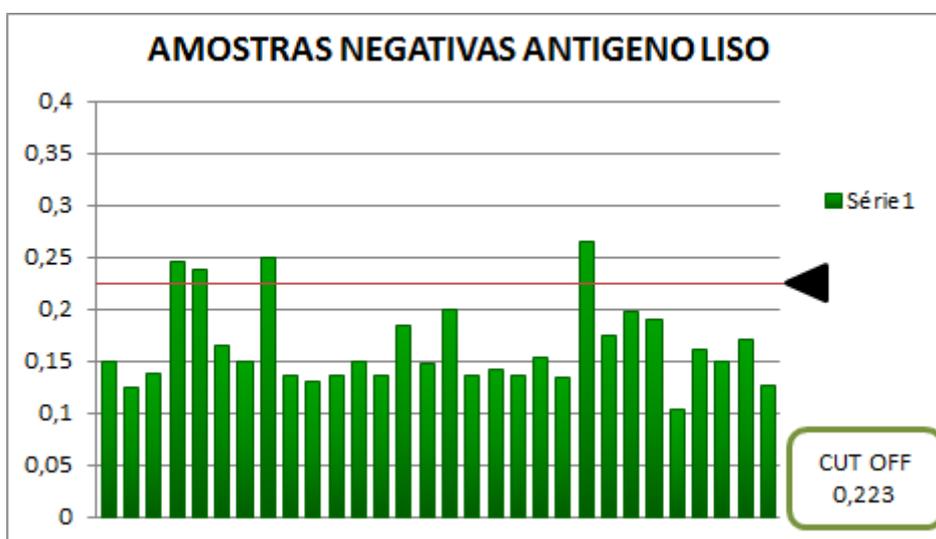


Figura 2 Valores de absorvância de soro de bovinos confirmados negativos.

Na avaliação do ELISA indireto utilizando o antígeno Rugoso verificou-se valores de densidade óptica variando nos animais confirmadamente positivos entre 0,069 e 0,234 (figura 3), nas amostras negativas entre 0,66 e 0,166, (figura 4).

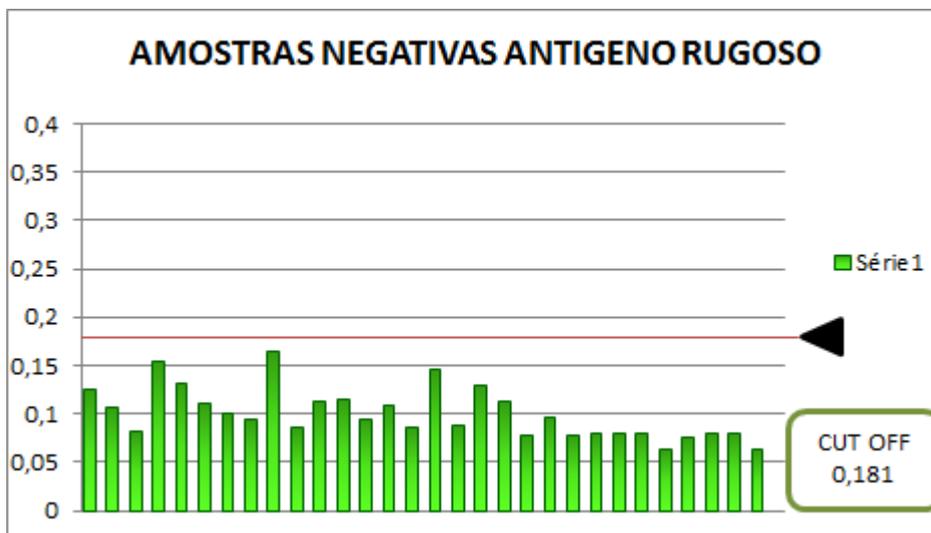


Figura 3 Valores de absorbância de soro de bovinos confirmados negativos.

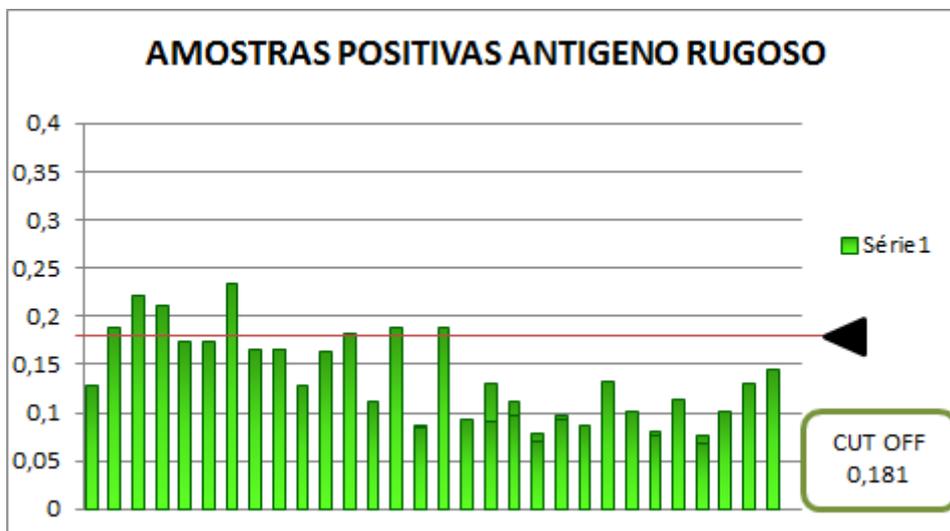


Figura 4 Valores de absorbância de soro de bovinos confirmados positivos.

O ELISA com antígeno liso (LPS)-liso obteve 33,33% de sensibilidade e 86,66%, enquanto o antígeno (LPS)-rugoso apresentou 23,33% de sensibilidade e 100% de especificidade. Apesar da especificidade relativamente

baixa nos dois testes, demonstra-se a capacidade do ELISA Indireto de diagnosticar animais positivos em titulações baixas nas outras provas como a prova do 2-Me e SAL, na sensibilidade os dois testes encontram-se em conformidade com os resultados de Putini (2008) no qual obteve valor de 100% de especificidade, e com os dados de Paweska (2002) no qual objetivou validar um teste de ELISA Indireto utilizando 4.803 soros de bovinos. Molnar (2002) comparou seis testes sorológicos para o diagnóstico da brucelose bovina e relata que na utilização de um kit comercial obteve uma boa sensibilidade e especificidade de 97,14% e 95,66%, respectivamente, sendo o ELISA indireto umas das técnicas com validade em seu estudo.

A tabela 1 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade dos testes ELISA conforme os seus respectivos pontos de corte. Na tabela 2 podem ser verificados os valores preditivos positivos e negativos de cada um dos testes.

**Tabela 1- Valores de sensibilidade, especificidade e cut-off**

<b>Sensibilidade/Especificidade ELISA</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>Cut-off</b>
ELISA LISO	33,33	86,66	0,223
ELISA RUGOSO	23,33	100	0,181

**Tabela 2 - Valores preditivos positivos e negativos.**

<b>ELISA indireto</b>	<b>Valor Preditivo Amostras Positivas (%)</b>	<b>Valor Preditivo Amostras Negativas (%)</b>
ELISA indireto com antígeno LISO	33,33	86,66
ELISA indireto com antígeno RUGOSO	23,33	100

Na comparação entre o ELISA indireto com antígeno liso e o ELISA indireto com antígeno rugoso, o coeficiente Kappa foi utilizado para a avaliação do grau de concordância entre os testes. A análise de concordância revelou 0,90 com IC de 95%, indicando uma boa concordância, o valor do coeficiente K foi de 48%, esses valores encontram-se em conformidade com o estudo de Soares (2012) que na padronização e validação do ELISA ID para diagnóstico de brucelose bovina, utilizando como antígeno lipopolissacarídeo e extrato protéico solúvel de *brucella abortus*, obteve uma concordância excelente entre os dois teste com antígenos diferentes.

Jardim (2009) utilizando um teste comercial, sugere que a técnica de ELISA ID não deva ser utilizada como prova de diagnóstico confirmatório definitivo de brucelose em rebanho não vacinado, não controlado para a doença, pois a alta sensibilidade e a baixa especificidade relativas apresentadas favorecem o

diagnóstico falso-positivo. O teste ELISA pode ser utilizado como prova de triagem em rebanho não vacinado, sobretudo em situação de futura fase de erradicação da doença, que requeira o uso de teste altamente sensível em rebanhos suspeitos de estarem infectados.

## **CONCLUSÃO**

O teste do ELISA Indireto traz como vantagens fácil padronização nos laboratórios, baixo custo e um resultado menos subjetivo do que as outras provas preconizadas pelo PNCETB. No ELISA realizado com o antígeno liso constatou-se sensibilidade de 33,33% e especificidade de 86,66%, já no teste do ELISA com o antígeno rugoso obteve-se sensibilidade de 23,33% e especificidade de 100%, esses valores sugerem a utilização do ELISA indireto como prova de triagem para brucelose bovina, já que o mesmo demonstra a capacidade de diagnosticar animais naturalmente infectados de não infectados.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA T. M. P., **Brucelose A Última Década no Centro Hospitalar da Cova da Beira, E.P.E.**, 2009, Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. Covilhã, Portugal, 2009.

ANTUNES J. M. A. P., MEGID J., *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1301-1312, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Manual Técnico, Brasília: MAPA, 2006.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A. Statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunology Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

GODFROID F.; TAMINIAU B.; DANESE I.; DENOEL P.; TIBOR A.; WEYNANTS V.; CLOECKAERT A.; GODFROID J.; LETESSON J. J. Identification of the Perosamine Synthetase Gene of *Brucella melitensis*16M and Involvement of Lipopolysaccharide O Side Chain in *Brucella* Survival in Mice and in acrophages. **Infection and Immunity**, v. 66, n.11, p. 5485–5493 Nov. 1998.

GOMES J. P. M. Gênero *Brucella* spp, **UFRGS**, Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Brucella%204-2013-1.pdf>> Acesso em: 30/11/2013.

JARDIM, G. C., PIRES, P. P., MATHIAS, L. A., & KUCHEMUCK, M. R. G. (2009). Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, 2(5), 131-142.

MATHIAS, L. A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo na diferenciação de anticorpos induzidos pela vacina B19, no diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 19-23, 1994.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C. *et. al.* Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, p.41-44, 2002

OLIVEIRA F. S., 2011, 93 fls, **Avaliação do papel da proteína Cinase associada ao receptor de interleucina-1 4 (IRAK-4) na resposta imuneinata durante a infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella Abortus***, Tese de Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais,

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia,  
2011

PAWESKA, J. "Validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Brucella abortus* in cattle sera using an automated ELISA workstation". **J. of Vet. Research**. Vol. 69, 2002, p 61-77.

PUTINI V. B., CRUZ R. B., SANTANA G. S., JORGE J. S., SILVA D. L., MOURA M., CARMINATI R., CERQUEIRA R. B., Padronização e avaliação da sensibilidade e especificidade de um teste elisa indireto para diagnóstico da brucelose bovina utilizando como antígeno a cepa DE B. abortus INATIVADA, 2008, **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 361-370.

SIADAT S. D., SALMANI A. S., e AGHASADEGHI M. R., Brucellosis Vaccines: An Overview, 2013, **Pasteur Institute of Iran**, Iran, v.12, n3.

SOARES P. M., NAVES J. H. F. F., TAVARES T. C. F., SOUZA F. A., GOMES D. O., GANDA M. R., SOARES M. M., LIMA A. M. C. R. Padronização e validação do elisa indireto para diagnóstico de brucelose bovina utilizando como antígeno lipopolissacarídeo e extrato protéico solúvel de *brucella abortus*, **IX A mostra da pós-graduação em ciências veterinárias e apresentação de trabalhos científicos da FAMEV UFU**, Vet. Not., Uberlândia, v.18. n. 2 (supl.), p. 61, jul-dez. 2012

## **CAPÍTULO II**

## **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**

### **Levantamento sorológico de Brucelose em bovinos monitorados no estado da Bahia**

*(Serological survey of brucellosis in cattle monitored in the estate of Bahia)*

Marcus Paulo de Matos Maturino<sup>1</sup>, Lourival Souza Silva Junior<sup>2</sup>, Diana de Oliveira Silva Azevedo<sup>2</sup>, Bianca Pimentel Silva<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos<sup>3</sup>, Robson Bahia Cerqueira<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Médico Veterinário Mestrando no programa de pós graduação em Defesa Agropecuária da UFRB, <sup>2</sup> Graduandos em Medicina Veterinária Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), <sup>3</sup> Professor Adjunto Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Rua Manoel Vilaboim, nº 09, Centro, Cruz das Almas – Bahia CEP 44380-000  
[mpmaturnio@yahoo.com.br](mailto:mpmaturnio@yahoo.com.br).

## **Levantamento sorológico de Brucelose em bovinos monitorados no estado da Bahia**

*Serological survey of brucellosis in cattle monitored in the estate of Bahia.*

Marcus Paulo de Matos Maturino<sup>1</sup>, Lourival Souza Silva Junior<sup>2</sup>, Diana de Oliveira Silva Azevedo<sup>2</sup>, Bianca Pimentel Silva<sup>2</sup>, Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos<sup>3</sup>, Robson Bahia Cerqueira<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Médico Veterinário Mestrando no programa de pós graduação em Defesa Agropecuária da UFRB, <sup>2</sup> Graduandos em Medicina Veterinária Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), <sup>3</sup> Professor Adjunto Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Rua Manoel Vilaboim, nº 09, Centro, Cruz das Almas – Bahia CEP 44380-000 [mpmaturnio@yahoo.com.br](mailto:mpmaturnio@yahoo.com.br).

### RESUMO

A brucelose é uma doença bacteriana de grande importância para a economia pecuária e para a saúde pública por se tratar de uma zoonose. É uma doença infecto-contagiosa que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Brucella*. Em bovinos, a espécie do gênero é a *Brucella Abortus* que são cocobacilos gram negativo, intracelulares facultativos, imóveis e não esporulado. A infecção apresenta evolução crônica e acomete animais de todas as idades, sendo mais frequente em indivíduos sexualmente maduros. O presente trabalho teve como objetivo investigar através da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia. Foram utilizados 666 animais, selecionadas aleatoriamente no momento do abate. O sangue foi coletado com finalidade de obtenção de soro, todas as amostras foram submetidas à prova de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova do 2mercaptoetanol (2-ME) e ELISA Indireto. Das amostras reagentes no teste do AAT, obteve-se uma prevalência estimada em 1,2%. A prevalência no teste do ELISA foi de 13,21% (n=86). Esse resultado sugere a ocorrência de falsos negativos quando se utiliza a prova do antígeno acidificado tamponado

Palavras chaves: Brucelose, Abatedouro, Prevalência, Soro.

## ABSTRACT

Brucellosis is a bacterial disease of great importance to the livestock economy and to public health because it is a zoonosis. It is an infectious disease that has etiologic agent with bacteria of the genus *Brucella*. In cattle, the species of the genus *Brucella* is *Abortuscoccobacilli* that are gram negative, facultative intracellular, real estate and not sporulated. The infection presents chronic and affects animals of all ages, being more frequent in sexually mature individuals. . This study aimed to investigate through serology for brucellosis, using the technique of indirect ELISA, samples from positive animals slaughtered in slaughterhouses inspected in the state of Bahia. 666 animals, randomly selected at slaughter were used. Blood was collected in order to obtain serum, all samples were subjected to a screening test Antigen Buffered Acidified (AAT), proof of 2-mercaptoethanol (2-ME) and Indirect ELISA. Of reagents in the test samples of AAT obtained an estimated prevalence of 1.2%. The prevalence in the ELISA test was 13.21% (n = 86). This result suggests the occurrence of false negatives when using the buffered acidified antigen test.

Key words: Brucellosis, Slaughterhouse, Prevalence, Soro.

## INTRODUÇÃO

A *Brucella Abortus* é considerada uma  $\alpha$ - Proteobacteria intracelular que causa infecções de longa duração, a cronicidade da infecção resulta da capacidade de Brucella a sobreviver no interior de macrófagos, devido ao seu lipopolissacarídeo (LPS) com propriedades e estrutura distintas do LPS de outras enterobactérias, incluindo uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação pelos macrófagos e evasão da resposta imune, o que constitui um dos principais mecanismos de virulência e replicação da Brucella. (KO E GARY, 2003; BARQUERO-CALVO *et. al.*, 2013).

A brucelose bovina é amplamente difundida em todo o mundo, mas especialmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano, e partes do México, da América Central e do Sul, sendo erradicada em alguns países como Finlândia, Noruega, Suécia, Dinamarca, Países Baixos, Bélgica, Suíça, Alemanha, Áustria, Hungria, Romênia e Bulgária, outros conseguiram liberar vários rebanhos e extensas áreas do seu território Inglaterra, Irlanda, Polônia, Canadá, Cuba, Panamá, Austrália e Nova Zelândia sendo o primeiro passo no processo de erradicação da doença (PESSEGUEIRO *et. al.*, 2003; LOBATO e ASSIS, 2006).

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser realizado de forma direta com o isolamento identificação do micro organismo ou indireta com o acompanhamento da resposta imunológica do animal via sorologia. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina, instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, preconiza a

utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico desta enfermidade sendo as provas de triagem o teste do anel do leite, antígeno acidificado tamponado e como prova confirmatória a prova do 2-ME (BRASIL, 2006).

Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas, nesta perspectiva a prova que é recomendada pelo PNCETB, é a prova de ELISA (Enzyme-linkedimmunosorbentassay), que pode ser indireta ou competitiva, é considerada uma prova rápida, que tem um alto grau de sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2006; PUTINI *et. al.*, 2008).

Nesse método, uma enzima, que reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido, é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação, então, a presença de produto colorido indica a presença de antígeno. Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas ( $10^{-9}$  g).

O presente trabalho teve como objetivo investigar através da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de soro foram colhidas no período compreendido entre agosto e dezembro de 2013, em dois abatedouros frigoríficos localizados nos territórios de identidade, Vitória da Conquista e Portal do Sertão, no estado da Bahia. Para o cálculo do número de animais a serem utilizados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança. O cálculo foi feito com a fórmula para amostras simples aleatórias (THRUSFIELD, 2007):

$$n = \frac{Z^2 \times p(1-p)}{d^2}$$

Onde: Z = coeficiente de confiança 99%, p = prevalência esperada de 50% (maximização de amostra), d = erro absoluto de 5%. Totalizando uma amostra de 666 animais. Os animais utilizados foram da espécie bovina, machos e fêmeas, sendo estas vacinadas ou não, identificadas pela marcação a fogo do lado esquerdo da cara do animal para vacinação da brucelose, com idade superior a 24 meses, foram escolhidos um dia do abate destes frigoríficos e as amostras foram escolhidas de todos os animais que entraram na linha de abate, todos esses frigoríficos abatiam animais oriundos de outras regiões do estado.

A coleta de sangue deu-se no ato da sangria dos animais, o sangue foi coletado em tubos de ensaio de 10ml sem anticoagulante, estes tubos foram

identificados e numerados, e permaneceram inclinados para facilitar o processo de retração do coágulo, visando a obtenção do soro para realização dos testes sorológicos, posteriormente as amostras foram remetidas ao LDI - Laboratório de Doenças Infecciosas do HVM - Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo UFRB. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm, posterior os soros foram transferidos para microtubos estéreis, que foram mantidos congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos. Todos os animais foram submetidos ao teste de triagem do antígeno acidificado tamponado (AAT) e ao ELISA indireto, os animais positivos nestas provas foram confirmados a sua situação sorológica com a utilização da Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Prova da Soroaglutinação Lenta (SAL).

Os testes realizados foram os preconizados pelo PNECBT do Ministério da Agricultura como as provas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Prova da Soroaglutinação Lenta (SAL) e o ELISA Indireto, utilizando-se antígeno liso, de acordo metodologia descrita por Maturino (2014) .

Para o estabelecimento das correlações entre as variáveis que caracterizam a resposta da Brucelose nos rebanhos bovinos analisados foi implementada uma Análise de Correspondências Múltiplas (LEBART *et. al.* 2000) por serem as respostas qualitativas nominais com três ou mais classes (BARROSO e ARTES, 2003). Desta forma foram utilizadas as saídas para as variáveis transformadas.

Foram testadas as prevalências referentes aos três diferentes métodos de diagnóstico (2ME/SAL; AAT e ELISA) via Modelos Lineares Generalizados (GLM)

para a distribuição Gama com função de ligação log, pois não foi constatada a normalidade dos dados. O modelo utilizado é descrito a seguir.

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon ; \text{ onde:}$$

$\hat{Y}$  = estimativa da variável resposta (prevalência) que pode variar de 0 a 100%;

$\beta_0$  = constante geral do modelo;

$\beta_1$  = coeficiente estimado para "x", cujo variou de 1 até n, com n = 3 níveis representando o fator "método de diagnóstico" (2ME/SAL; AAT e ELISA);

$\varepsilon$  = representação da estimativa para o erro aleatório do modelo.

Para avaliar as diferenças entre as médias foi feita uma comparação múltipla pelo método de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do Software R, versão 2.15.0 (2012).

## **RESULTADOS**

Os animais foram agrupados de acordo com a mesorregião, contemplado quatro mesorregiões: Mesorregião do Centro-Norte Baiano, Mesorregião do Centro-Sul Baiano, Mesorregião do Nordeste Baiano, Mesorregião Metropolitana de Salvador, e vinte e cinco municípios.

REGIÃO	n Amostral	PREVALÊNCIA	MÉDIA	DESV. PADRÃO	IC 95%	
NORDESTE	121	9%	0,14736	B	0,05374	0,00957
CENTRO NORTE	121	21%	0,17279	a	0,11987	0,02136
M SALVADOR	26	4%	0,16388	a	0,06074	0,02335
CENTRO SUL	398	13%	0,12609	c	0,09476	0,00931

Tabela 1: Prevalência para brucelose no teste do ELISA por Mesorregião.

Das amostras reagentes no teste do AAT, oito (8) foram confirmadas ao 2-ME, sendo a prevalência estimada em 1,2% (Gráfico 1). A prevalência no teste do ELISA foi de 13,21% (n=86), sendo que essas amostras foram submetidas aos testes confirmatórios preconizados pelo Ministério da Agricultura SAL e 2-ME, em que foi observada a seguinte distribuição: dos animais que foram considerados positivos no teste de ELISA, três (3) foram considerados inconclusivos, quatorze (14) foram considerados negativos e sessenta e nove (69) positivos, quando submetidos às provas confirmados SAL e 2-ME (Gráfico 2).

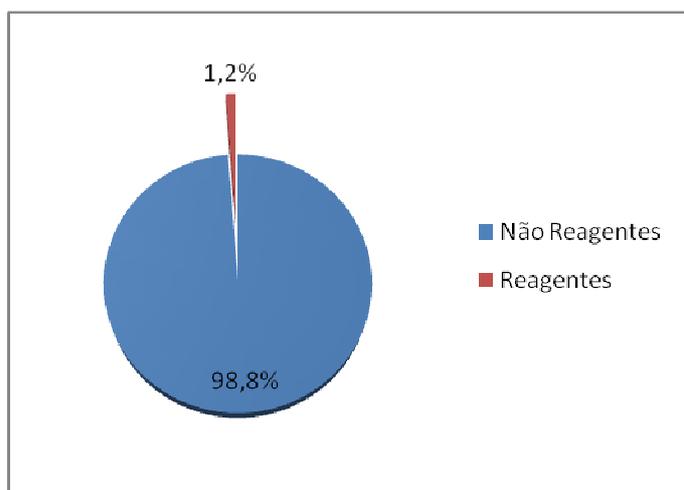


Gráfico1. Prevalência da brucelose bovina em relação aos testes do AAT e 2-ME.

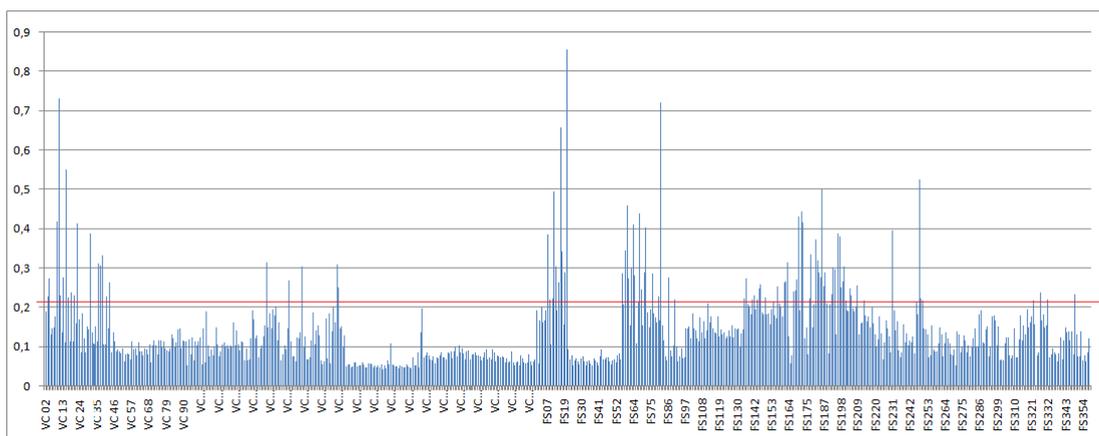


Gráfico 2. Valores de absorvância de soro de bovinos reagentes ao Teste ELISA indireto

A prevalência da brucelose bovina por região, quando analisada pelo teste do ELISA indireto, pode ser observada na Tabela 2, com uma prevalência máxima de 21% na Mesorregião Centro Norte mesorregião e uma mínima de 4% na região Metropolitana de Salvador, a média dos valores de absorvância no ELISA, obedece a uma distribuição em que a Mesorregião Centro Norte e Metropolitana de Salvador têm médias similares estatisticamente, e a Mesorregião Centro Sul e a Nordeste ambas divergem das demais. No entanto, não se comprovou associação significativa entre as regiões e a ocorrência de brucelose no estado da Bahia (Tabela 1).

Analisando a correlação das variáveis, sexo, vacinação, procedência do animal e das técnicas utilizadas, AAT, SAL, 2-ME, ELISA, em que a variável é representada pela interpretação da prova do 2-ME e SAL como preconizado pelo manual do PNCEBT, pode ser observado pela Tabela 2 que a correlação das variáveis próximas de 1 foi relevante entre as variáveis analisadas, sendo este o caso da correlação entre as variáveis sexo e vacinação, e as técnicas do

SAL e 2-ME e a variável situação, sendo observada uma correlação relevante entre as técnicas da prova do 2-ME a situação sorológica do animal e a variável ELISA.

	Sexo	Origem	AAT	SAL	2-ME	ELISA
Sexo	67%					
Origem	4%	12%				
AAT	14%	19%	1%			
SAL	-1%	7%	39%	25%		
2-ME	-2%	5%	39%	18%	98%	
ELISA	-9%	-2%	41%	-5%	90%	92

Tabela 2: Correlação entre as variáveis

Nos gráficos 3 e 4, são representadas as análises de regressão das técnicas de ELISA e SAL, ELISA e 2-ME, no qual observa-se uma distribuição similar nos dois gráficos da técnica do ELISA e uma estabilidade da técnica frente ao 2-ME e SAL, quando observado o comportamento do ELISA em titulações abaixo de 50, tanto no SAL, quanto no 2-ME, esse comportamento sugere uma maior estabilidade do ELISA indireto, frente as provas confirmatórias, preconizadas pelo MAPA, e a ocorrência de falsos negativos na prova do 2-ME.

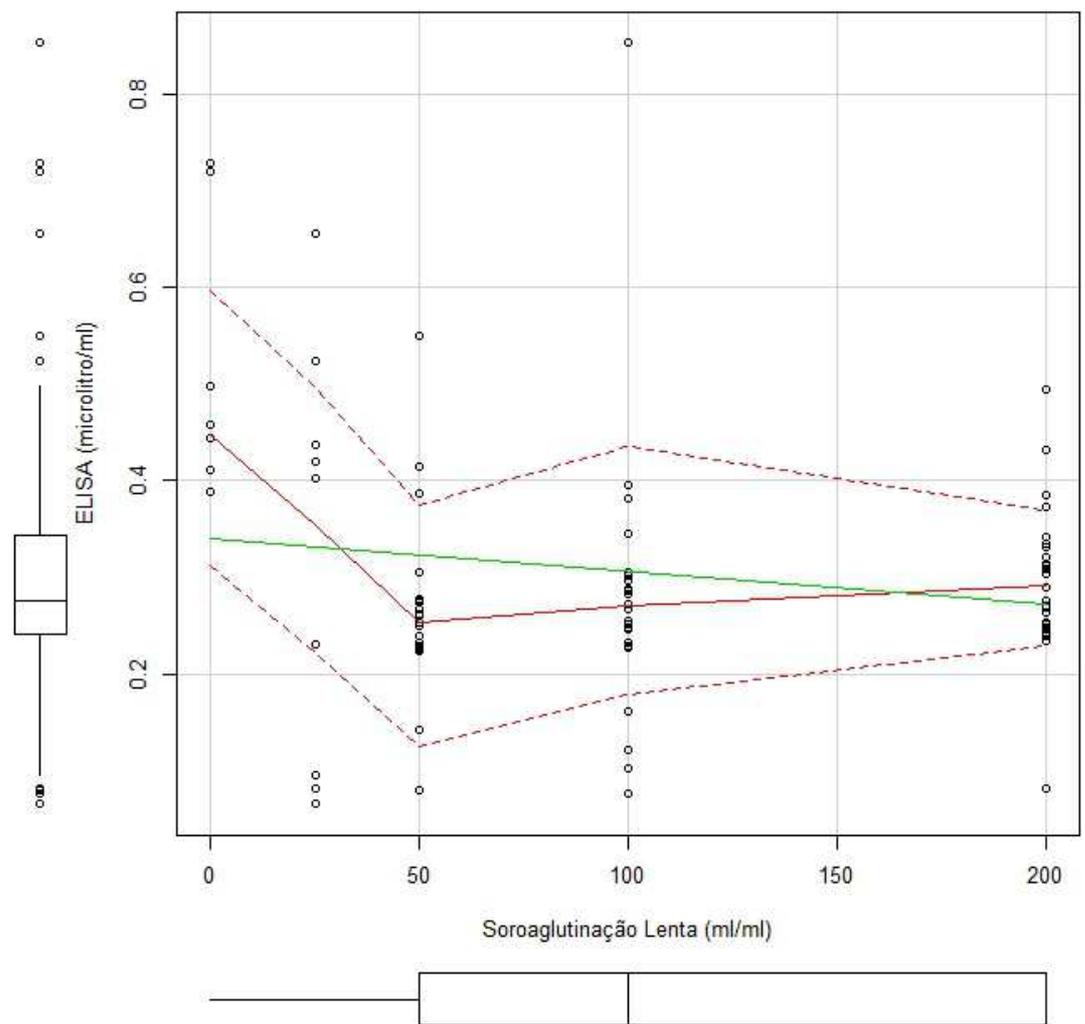


Gráfico 3. Análise de regressão SAL e ELISA

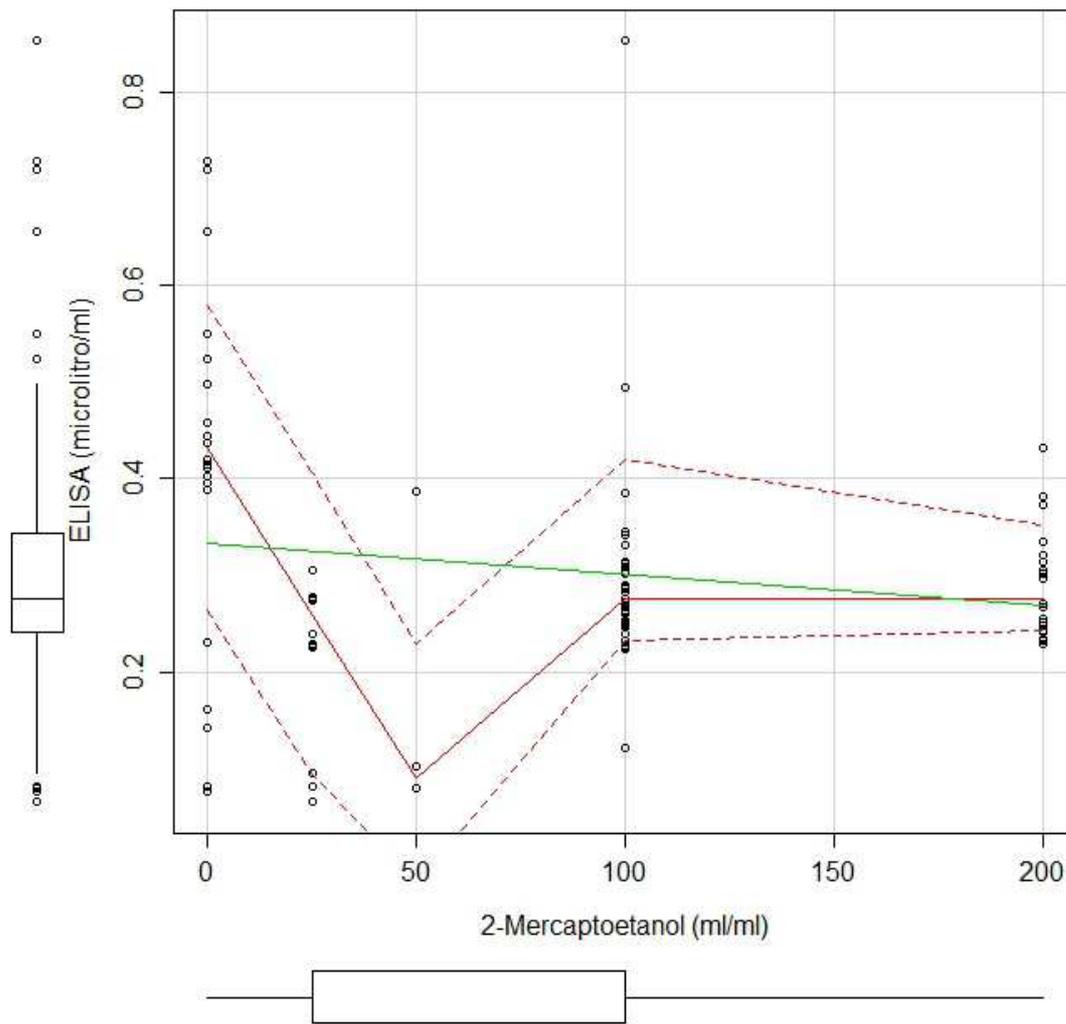


Gráfico 4. Análise de regressão 2-ME e ELISA

## DISCUSSÃO

A diferença dos resultados pode ser observada quando avaliada a prevalência da soropositividade das técnicas utilizadas, a prova do antígeno acidificado tamponado teve uma baixa sensibilidade para ser considerada uma prova de triagem, frente aos resultados obtidos, nas outras técnicas empregadas no presente trabalho, como o ELISA e o 2-ME, divergiu de Meirelles-Bartoli e Mathias (2010) que em seu trabalho analisou 644 amostras com as provas do AAT e 2-ME e concluíram que o teste do antígeno acidificado tamponado apresentou elevada sensibilidade relativa, como se espera de um teste de triagem, e que os dois testes confirmatórios apresentaram elevada especificidade.

Jardim *et. al.* (2006), em estudo com a utilização de dose reduzida de vacina B19 observou que as provas de fixação de complemento detectou 46,77% de positivos, o antígeno acidificado tamponado 67,74%, o 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta 87,09%, e do ELISA indireto 100% confirmando a superioridade do ELISA frente aos outros testes, sendo este capaz de diagnosticar de forma mais sensível os animais doentes.

A análise de correlação das técnicas demonstra uma afinidade, qual seja a superioridade do ELISA na capacidade de diferenciar animais infectados reagentes no teste de animais não infectados, também observada por Putini *et. al.* (2008).

A prevalência da brucelose bovina no estado da Bahia é considerada relativamente baixa, a investigação dos animais testados encontrou uma prevalência de 0,66% (ALVES, *et. al.*, 2009). Em um paralelo com outros estados da federação, como no Distrito Federal, 0,16% (2.019 animais examinados) (GONÇALVES *et. al.*, 2009); Espírito Santo, 3,5% (5.351 animais examinados) (AZEVEDO *et. al.*, 2009); Goiás, 1,4% (10.744 animais examinados) (ROCHA *et. al.*, 2009); Minas Gerais, 1,1% (20.643 animais examinados) (GONÇALVES *et. al.*, 2009b), Mato Grosso do Sul, 7,6% (9.466 animais de corte examinados) (CHATE *et. al.*, 2009); Mato Grosso, 10,2% (13.684 animais examinados) (NEGREIROS *et. al.*, 2009); Paraná, 1,7% (14.857 animais examinados) (DIAS *et. al.*, 2009b); Rio de Janeiro, 4,1% (8.239 animais examinados) (KLEIN-GUNNEWIEK *et. al.*, 2009); Rondônia, 6,2% (9.717 animais examinados) (VILLAR *et. al.*, 2009); Rio Grande do Sul, 1,0% (16.072 animais examinados) (MARVULO *et. al.*, 2009); Santa Catarina, 0,06% (7.801 animais examinados) (SIKUSAWA *et. al.*, 2009); Sergipe, 3,4% (4.757 animais examinados) (SILVA *et. al.*, 2009a); São Paulo, 3,8% (8.761 animais examinados) (DIAS *et. al.*, 2009); Tocantins, 4,4% (20.908 animais examinados) (OGATA *et. al.*, 2009), o que não entra em acordo com os dados obtidos no presente trabalho em nenhuma das técnicas avaliadas. SILVA JR. e colaboradores (2007) obtiveram uma prevalência para brucelose em soro sanguíneo bovino de 8,2%, ficando acima dos resultados encontrados neste estudo utilizando a técnica do AAT.

Em um paralelo com outros estados da federação, como Pará e Tocantins esses dados divergem bastante, de acordo com Viana (2010), observou-se uma

prevalência de soropositividade para brucelose de 16,6% para o gado do Pará e de 17,2% para os animais do Tocantins.

## **CONCLUSÃO**

O presente estudo sugere que após análise dos soros dos bovinos destinados ao abate no estado da Bahia, foram encontrados animais reagentes para brucelose através dos testes de triagem AAT, a prova confirmatória do 2-Mercaptoetanol e o ELISA indireto.

O ELISA indireto demonstrou ser eficaz e superior às outras técnicas empregadas, pois a mesma diagnosticou com mais precisão animais com titulações mais baixas que não foram diagnosticados pelo AAT e 2-ME.

Os resultados obtidos sugerem que a prova oficial de triagem, não diagnostica de forma precisa os animais reagentes para brucelose, podendo ocorrer falsos negativos quando se utiliza a prova do antígeno acidificado tamponado.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A.J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIANSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.6-13, 2009.
- ANTUNES J. M. A. P., MEGID J., *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1301-1312, 2013.
- AZEVEDO S.S., FERREIRA NETO J.S., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., GONÇALVES V.S.P., SOUZA A.C. e VASCONCELLOS S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**61:19-26.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Manual Técnico, Brasília: MAPA, 2006.
- BARQUERO-CALVO E.; MARTIROSYAN A.; ORDOÑEZ-RUEDA D.; ARCE-GORVEL V.; ALFARO-ALARCÓN A.; LEPIDI H.; MALISSEN B.; MALISSEN M.; GORVEL J. P. ; MORENO E. Neutrophils Exert a SuppressivEffect on Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella Abortus*. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, p.1-13, 2014.
- 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. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:46-55.
- DIAS R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., LIMA Z.M.B., PAULIN L.M.S., GUNNEWIEK M.F.K., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S. e FERREIRA F. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:118-125.
- \_\_\_\_\_. J.A., MÜLLER E.E., DIAS R.A., FREITAS J.C., AMAKU M., FERREIRA F., SILVA M.C.P., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:66-76.

FREITAS J. A.; OLIVEIRA J. P., Pesquisa de Infecção Brucélica em Bovídeos abatidos portadores de Bursite, **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.427-433, 2005

GONÇALVES V.S.P., RIBEIRO L.A., CALDAS R.A., FRANCISCO P.F.C., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e BORGES J.R.J. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:14-18.

\_\_\_\_ V.S.P., DELPHINO M.K.V.C., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., PORTO T.B., ALVES C.M., FIGUEIREDO V.C.F. e LÔBO J.R. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:35-45.

JARDIM G. C.; Pires P. P. ; MATHIAS L. A.; O. C. RIBEIRO.; KUCHEMUCK M. G. R. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella Abortus* . **Pesq. Vet. Bras.** 26(3):177-182, jul./set. 2006.

KLEIN-GUNNEWIEK M.F.C., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA F., GITTI C.B., PEREIRA L.A., FIGUEIREDO V.C.F., LOBO J.R., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:77-84.

KO J.; GARY A. S. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans., **Clinical Microbiology Reviews**, V.1, n. 1 , p. 65–78 Jan. 2003.

LOBATO F.; ASSIS R. A. **Brucelose Bovina**, beef point, Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/brucelose-bovina-28520/>> Acesso em: 12/10/2013.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>>, Acesso em: 20/02/2014.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 77, n. 1, p. 11-17, 2010.

MARVULO M.F.V., FERREIRA F., DIAS R.A., AMAKU M., GROFF A.C.M., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:93-102.

NEGREIROS R.L., DIAS R.A., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S., GONÇALVES V.S.P., SILVA M.C.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., FREITAS J. e AMAKU M. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:56-65.

OGATA R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., RODRIGUES A.L., AMAKU M., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S. e DIAS R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:126-134.

OIE. ORGANIZATION INTERNATIONAL EPIZOOTIES. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014.** Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>> Acesso em: 30/01/2014a.

\_\_\_\_\_. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Bovinebrucellosis. Terrestrial Animal Health Code. 2013.** Chapter 11.3. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2009/en\\_chapitre\\_1.11.3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11.3.htm)> Acesso em: 30/01/2014b

PESSEGUEIRO P.; BARATA C.; CORREIA J. Brucelose – uma revisão sistematizada, **Medicina Interna**, Lisboa, V. 10, N. 2, p. 91-100, 2003

PSN, ListofProkaryoticnameswithStanding in Nomenclature, Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>>, Acesso em: 20/02/2014.

PUTINI V. B., CRUZ R. B., SANTANA G. S., JORGE J. S., SILVA D. L., MOURA M., CARMINATI R., CERQUEIRA R. B., PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO COMO ANTÍGENO A CEPA DE B. abortus INATIVADA, 2008, **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 361-370.

R Development Core Team (2012).: **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.** Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

ROCHA W.V., GONÇALVES V.S.P., COELHO C.G.N.F.L., BRITO W.M.E.D., DIAS R.A., DELPHINO M.K.V.C., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e BRITO L.A.B. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:27-34.

SIADAT D. S, MOHAMMAD A. S. S., AGHASADEGHI R., 2012. **Brucellosis Vaccines: An Overview, Zoonosis**, Dr. Jacob Lorenzo-Morales (Ed.), Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/zoonosis/brucellosis-vaccines>>, Acesso em: 15/06/2013.

SIKUSAWA S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., MARTINS C., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:103-108.

SILVA V.G.S.O., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., COSTA E.L.S., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:109-117.

SILVA JÚNIOR, F.F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.295-300, 2007.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 610p.

VIANA, L. et al. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 3, p. 517-520, 2010.

VILLAR K.S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., BENITEZ F., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:85-92.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. P.; REIS, D. O.; GERMANO, P. M. L. Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob inspeção federal. **Ciência Rural**. v. 30, n. 2, p. 287- 291, 2000.

ALMEIDA T. M. P., **Brucelose A Última Década no Centro Hospitalar da Cova da Beira, E.P.E.**, 2009, Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE. Covilhã, Portugal, 2009.

ALTON, G. G., JONES, L. M., ANGUS, R. D., VERGER, J. M. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris. 1988, 189p Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO MONO 55\\_part1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_55_part1.pdf)> Acesso em: 30/01/2013.

ALVES, A.J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIANSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.6-13, 2009.

ANTUNES J. M. A. P., MEGID J., *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1301-1312, 2013.

AZEVEDO S.S., FERREIRA NETO J.S., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., GONÇALVES V.S.P., SOUZA A.C. e VASCONCELLOS S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:19-26.

BARQUERO-CALVO E.; MARTIROSYAN A.; ORDOÑEZ-RUEDA D.; ARCE-GORVEL V.; ALFARO-ALARCÓN A.; LEPIDI H.; MALISSEN B.; MALISSEN M.; GORVEL J. P. ; MORENO E. Neutrophils Exert a SuppressivEffecton Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella Abortus* .**PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, p.1-13, 2014.

BASTOS, Renata *et. al.* Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 2012, vol.32, n.10, pp. 957-962.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Manual Técnico, Brasília: MAPA, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 448p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. – Brasília: Anvisa, v. 09, 2013.

BRASIL, **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa)**, Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)>, Acesso em: 10/09/2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Certificações, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/registros-e-autorizacoes/certificacoes>> Acesso em: 12/01/2014.

CAMPOS, S. Prevalência de tuberculose bovina. **Revista Eletrônica CESVA**, Valença, Bahia, v.1, n.1, p.245, 2008.

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. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:46-55.

CORDEIRO, S. C. A importância do controle da Brucelose e da Tuberculose, Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1799>>, Acesso em: 05/01/2014.

CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, E. N. J. Brucellosis—new aspects of an old disease. **J. Appl. Microbiol.**, 98: 1270-81, 2005.

DASSO, M. G., **Brucelose bovina em rebanhos leiteiros do estado do rio grande do sul** 2006, 92 fls, dissertação apresentada universidade federal do rio grande do sul faculdade de agronomia, programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, 2006.

DIAS R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., LIMA Z.M.B., PAULIN L.M.S., GUNNEWIEK M.F.K., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S. e FERREIRA F. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:118-125.

\_\_\_\_\_. J.A., MÜLLER E.E., DIAS R.A., FREITAS J.C., AMAKU M., FERREIRA F., SILVA M.C.P., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:66-76.

DIMITROV, T.S.; PANIGRAHI, D.; EMARA, M.; AWNI, F.; PASSADILLA, R. Seroepidemiological and Microbiological Study of Brucellosis in Kuwait. **MedPrincPract.** V.13.N. 4. P. 215-9, 2004.

FERREIA A. M., FERREIA DE SÁ W., VIANA J. H. M. CAMARGO L. S. A., Brucelose, 2007, **Embrapa**, Disponível em : <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_149\\_217\\_20039244.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_149_217_20039244.html)> Acesso em 08/10/2013.

FREITAS J. A.; OLIVEIRA J. P., Pesquisa de Infecção Brucélica em Bovídeos abatidos portadores de Bursite, **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.427-433, 2005

GARCIA M. e MARTINS L. S. **Brucelose**, Disponível em: <[http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula\\_brucelose.htm](http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula_brucelose.htm)> Acesso em: 30/11/2013.

GODFROID F.; TAMINIAU B.; DANESE I.; DENOEL P.; TIBOR A.; WEYNANTS V.; CLOECKAERT A.; GODFROID J.; LETESSON J. J. Identification of the Perosamine Synthetase Gene of *Brucella melitensis* 16M and Involvement of Lipopolysaccharide O Side Chain in *Brucella* Survival in Mice and in acrophages. **Infection and Immunity**, v. 66, n.11, p. 5485–5493 Nov. 1998. GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; KUBY, J. Immunology. 5th ed. New York: WH Freeman, 2002.

GOLDING, B.; SCOTT, D. E.; SCHARF, O.; HUANG, L. Y.; ZAITSEVA, M.; LAPHAM, C.; ELLER, N.; GOLDING, H. Immunity and protection against *Brucella Abortus*. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, Paris, v. 3, n. 1, p. 43-48, 2001.

GOLDSBY, R. A.; Kindt, T. J., OSBORNE, B. A. Kuby Immunology, 7th ed. New York: W.H. Freeman, 2012.

GONÇALVES V.S.P., RIBEIRO L.A., CALDAS R.A., FRANCISCO P.F.C., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e BORGES J.R.J. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:14-18.

\_\_\_\_\_. V.S.P., DELPHINO M.K.V.C., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., PORTO T.B., ALVES C.M., FIGUEIREDO V.C.F. e LÔBO J.R. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:35-45.

GOMES J. P. M. Gênero *Brucella* spp, **UFRGS**, Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAneros%20Brucella%204-2013-1.pdf>> Acesso em: 30/11/2013.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Vet. Microbiol.**, 90: 281-97, 2002.

GEISHOFER, R. A., **Casos de Brucelose e Tuberculose em Bovinos Abatidos Sob Inspeção Estadual ou Federal no Estado de Mato Grosso do Sul**, 2008, 28 fls, Trabalho monográfico do curso de pósgraduação *Latu sensu* em Higiene e inspeção de produto de Origem Animal - Universidade Castelo Branco, 2008.

HOMEM, V. S. F. **Brucelose e tuberculose bovinas no município de Pirassununga, SP: prevalências, fatores de risco e estudo econômico**. 112p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

IDAF, **BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO**, 2011, Disponível em: <[http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim\\_Brucelose\\_01.pdf](http://www.idaf.es.gov.br/Download/Boletim_Brucelose_01.pdf)>, Acesso em: 16/03/2013.

JARDIM G. C.; PIRES P. P. ; MATHIAS L. A.; O. C. RIBEIRO; KUCHEMUCK M. G. R. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella Abortus* . **Pesq. Vet. Bras.** 26(3):177-182, jul./set. 2006.

KIRINUS J. K., FRUET A.P. B., TEIXEIRA C., DÖRR A. C., NÖRNBERG J. L., APLICAÇÃO DA GENÉTICA MOLECULAR PARA A MELHORIA DA QUALIDADE DA CARNE BOVINA, 2014, **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**– REGET,- v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 165-174

KIM, S.; WATARAI, M.; MAKINO, S.; SHIRAHATA, T. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. **Microb. Pathog.**, 33: 225-37, 2002.

KLEIN-GUNNEWIEK M.F.C., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA F., GITTI C.B., PEREIRA L.A., FIGUEIREDO V.C.F., LOBO J.R., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:77-84.

KO J.; GARY A. S. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans., **Clinical Microbiology Reviews**, V.1, n. 1 , p. 65–78 Jan. 2003.

LAGE A.P., POESTER FP, GONÇALVES VSP, ROXO E, MÜLLER EE, CAVALLÉRO JCM, FERREIRA-NETO JS, MOTTA PMPC, FIGUEIREDO VCF, LÔBO JR. Programa

nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. **Cad. Tec Vet. Zootec**, n.47, p.99-110, 2005.

LAGE A.P., GONÇALVES V.S.P., LOBO JR. O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal. **Leite Integral**, v.3, p.40-46, 2008.

LAPAQUE N.; Moriyon I.; Moreno E.; Gorvel J.P. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor, **Current Opinion in Microbiology**, v.8 p.60–66, 2005.

LOBATO F.; ASSIS R. A. **Brucelose Bovina**, beef point, Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/brucelose-bovina-28520/>> Acesso em: 12/10/2013.

LUCAS, A. 2006. **Simulação de impacto econômico da Brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões centro oeste, sudeste e sul do Brasil**. 124 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>>, Acesso em: 20/02/2014.

MANUAL DE ZOONOSES, **Programa de Zoonoses da Região Sul** V. 1, Ed. 1, p. 9-21, 2009.

MARIA-PILAR, J. B.; DUDAL, S.; DORNAND, J.; GROSS, A. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 114, n. 3, p. 227-238, 2005.

MARVULO M.F.V., FERREIRA F., DIAS R.A., AMAKU M., GROFF A.C.M., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 61:93-102.

MATHIAS, L. A.; MEIRELLES, R. B.; BUCHALA, F. G. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella Abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 1, p. 18-22, 2007.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 77, n. 1, p. 11-17, 2010.

NAOUM P. F., **Métodos de avaliação Laboratorial**, Disponível em: <<http://www.ciencianews.com.br/aulavirt/metodos.pdf>>, Acesso em: 20/02/2014.

MEÇA K. K. O. L.; VASCONCELOS A. C.; MORO L., Inibição de apoptose e retardo da maturação placentária: um provável mecanismo da retenção placentária na brucelose bovina, **Biosci. J.**, v. 22, n.1, p. 163-174, 2006.

MINHARRO, S. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella Abortus* isoladas de bovinos no Brasil [online]. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/LGPD-7SUNFX>> Acesso em 05/02/2014.

MOLINA L., Aspectos Clínicos da Brucelose Bovina, **Rehagro**, Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1416>>, Acesso em: 19/10/2013.

MONTEIRO, L. A. R.C.; PELLEGRIN, A. O; ISHIKAWA, M. M.; OSORIO, A. L. A.R.. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 2006, vol.26, n.4, pp. 217-222.

NEGREIROS R.L., DIAS R.A., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S., GONÇALVES V.S.P., SILVA M.C.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., FREITAS J. e AMAKU M. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:56-65.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014.** Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>> Acesso em: 30/01/2014a

\_\_\_\_\_. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Bovinebrucellosis. Terrestrial Animal Health Code. 2013.** Chapter 11.3. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2009/en\\_chapitre\\_1.11.3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11.3.htm).> Acesso em: 30/01/2014b

OLIVEIRA F. S., 2011, 93 fls, **Avaliação do papel da proteína Cinase associada ao receptor de interleucina-1 4 (IRAK-4) na resposta imune inata durante a infecção causada pela bactéria intracelular *Brucella Abortus***, Tese de Doutorado Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, 2011.

OGATA R.A., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R., RODRIGUES A.L., AMAKU M., FERREIRA F., FERREIRA NETO J.S. e DIAS R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:126-134.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 29-31, 2007. Supplement.

PAULIN, L.M; FERREIRA NETO, J.S.A Experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivo Instituto Biológico**. São Paulo. v. 68, n.2, p.105-112, abr./jun. 2002.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. O combate à brucelose bovina: situação brasileira. Jaboticabal: Funep, 2003, 154 p.

PELLEGRIN A. O.; LEITE R. M. H; Sereno J. R. B.; LAGE A. P.; LEITE R. C. RAVAGLIA E., Brucelose Bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares, Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT58.pdf>>, Acesso em: 11/04/2013.

PELERITO A., CORDEIRO R., MATOS R., SANTOS M. A., SOERIO S., NÚNCIO S., Brucelose humana: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infecção entre 2002 e 2013, Disponível em: <[http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2343/3/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_9\\_2014\\_artigo6.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2343/3/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_9_2014_artigo6.pdf)> Acesso em: 01/02/2014

PESSEGUEIRO P.; BARATA C.; CORREIA J. Brucelose – uma revisão sistematizada, **Medicina Interna**, Lisboa,V. 10, N. 2, p. 91-100, 2003

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p.55-62, 2002.

PUTINI V. B., CRUZ R. B., SANTANA G. S., JORGE J. S., SILVA D. L., MOURA M., CARMINATI R., CERQUEIRA R. B., PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDOCOMO ANTÍGENO A CEPA DE *B. abortus* INATIVADA, 2008, **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 361-370.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, Wiley-Blackwell, 2011, 512p.

R Development Core Team (2012). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em<<http://www.R-project.org>>.

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

RAJASHEKARA G.; GLOVER D.A.; KREPPS, M.; SPLITTER, G.A. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. **Cellular microbiology**, Oxford, [online], v.10, n. 7, p.1459-1473, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462.5822.2005.00570.x/abstract>>. Acesso em: 30/08/2013.

RIBEIRO M. G.; MOTTA R. G.; ALMEIDA C. A. S. Brucelose eqüina: aspectos da doença no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.83-92, abr./jun. 2008.

ROCHA W.V., GONÇALVES V.S.P., COELHO C.G.N.F.L., BRITO W.M.E.D., DIAS R.A., DELPHINO M.K.V.C., FERREIRA F., AMAKU M., FERREIRA NETO J.S., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e BRITO L.A.B. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:27-34.

SANTA CATARINA, **Protocolo Estadual De Vigilância E Manejo Clínico De Brucelose Humana**, Disponível em: <[www.dive.sc.gov.br/.../Protocolo\\_Clinico\\_de\\_Brucelose\\_Humana.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/.../Protocolo_Clinico_de_Brucelose_Humana.pdf)> Acesso em: 15/04/2013.

SÃO PAULO. (Estado). **Coordenadoria de Defesa Agropecuária**. SIDASP Web. Disponível em: <[www.cda.sp.gov.br/sivesa/www/relatorios/?main=Relat%F3rioseaction=fechamentoBruceloseemodule=Resultado%20BruceloseRelat%F3rios](http://www.cda.sp.gov.br/sivesa/www/relatorios/?main=Relat%F3rioseaction=fechamentoBruceloseemodule=Resultado%20BruceloseRelat%F3rios)>. Acessado em: 23/01/2013.

SEYED DAVAR SIADAT, ALI SHARIFAT SALMANI AND MOHAMMAD REZA AGHASADEGHI 2012. **Brucellosis Vaccines: An Overview, Zoonosis**, Dr. Jacob Lorenzo-Morales (Ed.), Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/zoonosis/brucellosis-vaccines>>, Acesso em: 15/06/2013.

SIKUSAWA S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., MARTINS C., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:103-108.

SILVA V.G.S.O., DIAS R.A., FERREIRA F., AMAKU M., COSTA E.L.S., LÔBO J.R., FIGUEIREDO V.C.F., GONÇALVES V.S.P. e FERREIRA NETO J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61:109-117.

SOUZA C. E.; **Brucelose o Prejuízo Invisível**, Disponível em: <<http://www.diarioweb.com.br/noticias/imp.asp?id=63508>> Acesso em: 23/01/2013

TACH, Cattle Brucellosis Found in Herd in Starr County Local Producers Urged to Comply with TAHC Regulations **Texas Animal Health Commission** Disponível em: <[http://www.tahc.state.tx.us/news/pr/2011/2011Feb\\_BrucellosisInStarrCounty.pdf](http://www.tahc.state.tx.us/news/pr/2011/2011Feb_BrucellosisInStarrCounty.pdf)>, Acesso em: 15/01/2014.

VALENTE, Luiza Carneiro Mareti; VALE, Sônia Maria Leite Ribeiro do e BRAGA, Marcelo José. Determinantes do uso de medidas sanitárias de controle da brucelose e tuberculose bovinas. **Rev. Econ. Sociol. Rural [online]**. 2011, vol.49, n.1, pp. 215-231. ISSN 0103-2003.

VERONESI, R., FOCÁCCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v.1,2. 1785p.

VIANA, L. et al. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, v. 77, n. 3, p. 517-520, 2010.

VILLAR K.S., AMAKU M., DIAS R.A., FERREIRA NETO J.S., BENITEZ F., GONÇALVES V.S.P., FIGUEIREDO V.C.F., LÔBO J.R. e FERREIRA F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 61:85-92.

XAVIER M. N., PAIXÃO T. A., POESTER F. P., LAGE A.P., SANTOS R.L. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella Abortus*. **J Comp Pathol**. v.140, 149-157, 2009.

WRIGHT, P; NIELSEN, K. H. Current and future serological methods: Advances in brucellosis research. Austin: Texas A e M University Press, College Station.1990.p.305-319.

WERLING, D.; JUNGI, W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. **Vet Immunol and Immunopathol**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2003.

WHO World Health Organization, Brucellosis in humans and animals, **World Health Organization**, Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>>, Acesso em: 10/09/2013.