

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA**

KEILA PATRÍCIA CARDOSO ROCHA

**UTILIZAÇÃO DO TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO
DA BRUCELOSE EM AMOSTRAS SOROLÓGICAS DE BÚFALAS**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Janeiro - 2016

KEILA PATRÍCIA CARDOSO ROCHA

**UTILIZAÇÃO DO TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO
DA BRUCELOSE EM AMOSTRAS SOROLÓGICAS DE BÚFALAS**

Trabalho de conclusão submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Vanderly Andrea

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Janeiro - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

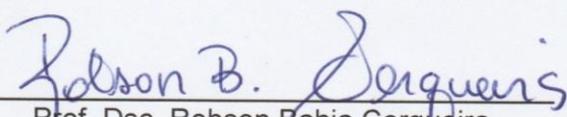
--

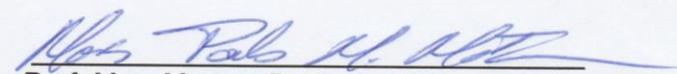
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

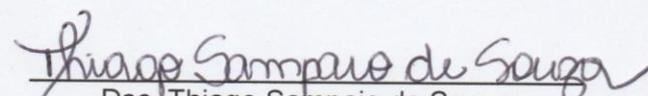
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

KEILA PATRICIA CARDOSO ROCHA

UTILIZAÇÃO DO TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE
EM AMOSTRAS SOROLÓGICAS DE BÚFALAS


Prof. Dsc. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Prof. Msc. Marcus Paulo de Matos Maturino
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Dsc. Thiago Sampaio de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 05 de janeiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sinvaldo Alves Rocha e Luzia de Oliveira Cardoso Rocha, aos meus irmãos Leily, Feliciano e Daniel, aos meus sobrinhos e ao meu esposo Pedro Vitor D. Brandão, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida, por seu amor infinito, e por me abençoar e me dar forças para realizar meu trabalho e vencer os obstáculos.

A toda minha família, pelo apoio, demonstrações de carinho e orações, em especial aos meus pais, irmãos, sobrinhos e esposo, os quais amo muito.

À Professora Maria Vanderly Andréia que me acolheu durante esses anos, que me ensinou tanto, e mora no meu coração.

Ao meu orientador, Robson B. Cerqueira, que é e sempre será um grande exemplo, obrigada pela ajuda e cooperação.

Aos professores que participaram comigo dessa jornada.

Ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB pelo auxílio a pesquisa e bolsa de estudos concedidos.

Aos amigos, companheiros e colegas da Universidade que participaram de forma direta e indireta do meu aprendizado, Apolo, Bianca, Caline, Diana, Delcivan, Gabriel, Jaiala, Kelly, Lourival, Luana, Martha e Willian por essa linda amizade, pelas risadas e resenhas juntos, ajuda nos estudos, carinho e amor constante nessa caminhada.

Aos demais amigos que, de alguma forma me ajudaram nesse período aqui em Cruz das Almas.

Muito obrigada!

“Andai em sabedoria para com os que estão de fora, usando bem cada oportunidade. A vossa palavra seja sempre com graça, temperada com sal, para saberes como deveis responder a cada um”.

Colossenses 4:5-6

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Documento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, sob o projeto de pesquisa número: 23007.003108/20015-84, durante a reunião ocorrida no dia 31 de março de 2015, sendo considerados éticos os procedimentos apresentados no protocolo.

UTILIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE EM AMOSTRAS DE SORO DE BÚFALAS

RESUMO: A brucelose é uma enfermidade infecciosa que acomete os animais domésticos, sendo caracterizada por aborto e infertilidade, trata-se de uma zoonose e gera grandes prejuízos à pecuária. Devido à crescente expansão da bubalinocultura no Estado da Bahia, o presente trabalho teve como objetivo comparar o desempenho dos testes de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto, na investigação da *Brucella abortus* em soro de fêmeas bubalinas. Foram coletadas amostras de sangue (soro) em 118 Búfalas (*Bubalus bubalis*), sendo essas vacinadas com a vacina B19. Os animais foram selecionados de formas aleatórias. Os soros desses animais foram submetidos à Técnica do Antígeno Acidificado Tamponado e ao ELISA Indireto. Das 118 amostras de soros examinados através na técnica AAT, nenhuma amostra foi reagente a técnica. Assim, as mesmas amostras foram testadas pelo método de ELISA Indireto, onde encontrou-se 82 amostras reagentes. Dessa forma, conclui-se que a técnica do ELISA Indireto para teste de diagnóstico de triagem em bubalinos é uma boa opção por possuir excelente desempenho.

Palavras-chave: Aborto, *Brucella abortus*, Sanidade, Zoonose.

USE OF A TEST INDIRECT ELISA FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN BUFFALOES SERUM SAMPLES

ABSTRACT: Brucellosis is a bacterial infection that spreads from animals to people. In livestock it affects productive outcomes by causing spontaneous abortions in females and infertility in males. Regarding to the effects of brucellosis in buffalo production, this study were designed to compare the acidified buffered Antigen diagnostic test to indirect ELISA test performance in serum buffalo females. Were used 118 animals, all of which were previously vaccinated by B19 to prevent them from *brucella* agent. Furthermore, blood fluid samples were collected and randomly submitted in two different methods of brucellosis diagnosis: acidified buffered antigen diagnostic and indirect ELISA test. Samples analyzed by ATT technique did not reacted, nevertheless the same samples were submitted in indirect ELISA test and 82 were reacted positively. In accordance with this results, was concluded that the Indirect ELISA test is the best choice to the brucellosis diagnostic.

Key-words: Abortion, *Brucella abortus*, Sanity, Zoonosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	GERAL	13
2.2	ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	BREVE HISTÓRICO DA BUBALINOCULTURA	14
3.2	AGENTE ETIOLÓGICO	15
3.3	CARACTERÍSTICA EPIDEMIOLÓGICA DA ENFERMIDADE	17
3.4	TRANSMISSIBILIDADE.....	18
3.5	RESPOSTA IMUNE	20
3.6	PATOGENIA	22
3.7	SINAIS CLÍNICOS	23
3.8	DIAGNÓSTICO	24
	3.8.1 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	25
	3.8.2 <i>Diagnóstico clínico</i>	29
3.9	MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	ÁREA DE ESTUDO	32
4.2	ANIMAIS	33
4.3	COLETA DE AMOSTRAS	34
4.4	AAT (ANTIGENO ACIDIFICADO TAMPONADO)	34
4.5	ELISA INDIRETO.....	35
4.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os búfalos são considerados uma alternativa eficaz de produção de proteína de origem animal (carne e leite) no Brasil (NADIR JÚNIOR *et al.*, 2007). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015) relata que no ano de 2014 o número do rebanho bubalino no Brasil foi de 1.319.478 cabeças, e a Bahia possuía 25.128, sendo o 10º estado criador de bubalinos, o que corresponde a 1,9% da participação do efetivo nacional. O primeiro estado criador de búfalos é o Pará, com 493.646 cabeças (37,4%) e o Amapá, em segundo, com 285.778 cabeças (21,7%). As maiores mesorregiões da Bahia em criação de bubalinos são: o Sul Baiano, com 11.226 cabeças e o Centro Sul Baiano, que possui 4.964 cabeças.

A Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (2015) busca aplicar medidas que visam a proteção da humanidade, preocupando-se com a inocuidade de alimentos de origem animal e a melhoria na saúde animal, através de medidas de diminuição da disseminação de vários tipos de enfermidades em diversas regiões mundiais, as quais causam importantes problemas sanitários. Com isso, a OIE prescreve uma lista de doenças de notificação obrigatória de várias espécies, dentre essas, uma doença de notificação obrigatória para Bovinos e Bubalinos, segundo a determinação da OIE, é a Brucelose.

A brucelose, assim como várias outras doenças que acometem os animais de produção, causa grande perda e forte impacto econômico, além de trazer prejuízo à saúde da população por se tratar de uma zoonose (ASSENGA *et al.*, 2015). Assim, por se tratar de doença que provoca grande perigo para a população, são instituídas medidas de controle eficaz, incluindo diagnóstico precoce e descarte dos animais infectados, a fim de evitar a disseminação desse agente e com intuito de uma posterior erradicação (NADIR JÚNIOR *et al.*, 2012; OLSEN; TATUM, 2010).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil - MAPA (2014), até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes

suprirá 44,5% do mercado mundial. Assim o Ministério da Agricultura ver a saúde animal, numa visão ampliada, que envolve questões relacionadas a enfermidades dos animais, saúde pública, controle dos riscos em toda a cadeia alimentar, assegurando a oferta de alimentos seguros e bem-estar animal. Desse modo, o MAPA criou, através do Regulamento Técnico, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT, a fim de aplicar medidas como: prevenção e a determinação de testes para o diagnóstico da enfermidade, tudo visando à melhoria da saúde animal e a inocuidade de alimentos de origem animal. Visto que essa enfermidade tem sido mundialmente relatada nos animais e nos seres humanos e sendo essa amplamente disseminada em diversas regiões mundiais.

De acordo Silva *et al.* (2014), seria necessário criar um programa de acompanhamento sorológico de *Brucella abortus* específico para búfalos, devido ao contato de proximidade entre os búfalos e o gado, e o crescimento constante de sua população, pois os búfalos podem se tornar um obstáculo para o sucesso do PNCEBT no Brasil. Diante do exposto, justifica-se a importância desse trabalho sobre a utilização de um teste ELISA indireto, visando a utilização de técnicas de diagnóstico mais eficazes para o controle da enfermidade em Bubalinos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Comparar o desempenho dos testes de diagnósticos AAT e ELISA indireto, na investigação da *Brucella abortus* em soro de fêmeas bubalinas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar soroepidemiologicamente bubalinos reagentes para brucelose;
- Utilizar o teste do antígeno Acidificado Tamponado para investigação da brucelose em amostras de bubalinos;
- Demonstrar a possibilidade do uso do ELISA indireto como método de diagnóstico de *Brucella abortus* em Bubalinos;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BREVE HISTÓRICO DA BUBALINOCULTURA

A bubalinocultura se constitui em alternativa viável de produção de carne, leite e tração, prática comum em muitos países de todo o mundo, demonstrando suas múltiplas funções (RAMOS et al., 2004). Estima-se que a população mundial de búfalos é de aproximadamente 194 milhões de cabeças, com distribuição mundial, sendo que 96,92% estão localizados na Ásia conforme descrito na tabela 1, com aumento anual de 18 milhões nos últimos dez anos (FAO, 2015; SETHI, 2010).

Tabela 1: Distribuição mundial do rebanho bubalino em 2013.

Continente	N° de animais	%
África	4.200.025,00	2,167%
América	1.339.127,00	0,691%
Brasil	1.332.284,00	0,687%
Ásia	187.855.961,00	96,922%
Europa	425.858,00	0,220%
Oceania	210,00	0,0001%
Valor Global	193.821.181,00	100,00%

Fonte: Adaptado da FAO (2015).

Há pouco mais de um século, os búfalos foram introduzidos no Brasil, adaptaram-se bem aos climas, e formas de manejo variado. O rebanho bubalino do Brasil ao longo do tempo obteve um crescimento surpreendente (ANDRADE; GARCIA, 2005; BERNARDES, 2007). Segundo dados do IBGE, (2015) e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2015), o efetivo rebanho bubalino brasileiro é de aproximadamente 1,3 milhões de cabeças, sendo esse 99,49% do total do rebanho das Américas.

Marques e *et al.* (2000) descrevem que os búfalos são animais ecológicos, produzindo onde o bovino mal consegue sobreviver. O manejo sanitário tem a finalidade de impedir que doenças interfiram no desempenho produtivo do rebanho. Há várias doenças que podem interferir na produção e na qualidade sanitária, tais

como: brucelose, leptospirose, entre outras (OLIVEIRA, 2006). Os bubalinos também são acometidos pela infecção causada pelo protozoário coccídio como *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, além de infecções bacterianas como Brucelose e Leptospirose, enfermidades essa que causam problemas reprodutivos (GONDIM et al., 2007; SOUZA et al., 2001; FIALHO et al., 2009).

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

A Brucelose é conhecida como Febre de Malta, Febre Ondulante, Febre Mediterrânea ou Doença de Bang, tida por Febre por que na Ilha Mediterrânea de Malta, efetuou-se a primeira definição clínica com o nome de febre remitente gástrica mediterrânea. Formou uma comissão com alguns bacteriologistas, dentre eles, Sir David Bruce, que observaram que a bactéria consistia num bacilo, alterando-se a nomenclatura original de *Micrococcus*, para o nome de *Brucella*, em homenagem a David Bruce (MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007).

Causada por bactérias que pertencem ao gênero *Brucella*, de caráter infeccioso, família *Brucellaceae*, parasita intracelular facultativo, o qual pode multiplicar-se no interior de macrófagos, apresenta-se microbiologicamente como cocabacilos ou bastonetes curtos, gram-negativos, que crescem em condições aeróbios ou microaerófilos, imóveis, sem flagelo na sua estrutura, com 0,5 a 0,7 µm de diâmetro e 0,6 a 1,5 µm de comprimento, sendo esses não formadores de esporos e desprovidos de cápsulas (BARBOSA et al., 2013; MOLINARO, 2009; NIELSEN et al., 2004). Diversas espécies são reconhecidas dentro do gênero *Brucella* e a classificação baseia-se principalmente sobre a diferença na patogenicidade e na preferência de hospedeiro (CARDOSO et al., 2006).

Essas bactérias são classificadas ainda por suas características bioquímicas e antigênicas, sendo possível classificar as espécies de *Brucella* da seguinte forma: *B. melitensis*; *B. abortus*; *B. suis*; *B. canis*; *B. neotomae*; *B. ovis*; *B. ceti*; *B. pinnipedialis*; *B. microti* e *B. inopinata*. Podem ser divididas em grupos antigenicamente distintos: as lisas e as rugosas, sendo que para as quatro últimas o

grupo antigênico ainda é desconhecido, e os três primeiros são subdivididos em biovars com base nas propriedades culturais e sorológicas (BARBOSA *et al.*, 2013; FAO, 2015; FOSTER *et al.*, 2007; POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002; SCHOLZ *et al.*, 2008).

Assim, as estirpes de *Brucella* expressam LPS lisa (S-LPS) ou LPS rugosa (R-LPS) como antígeno de superfície, sendo que, uma das diferenças na estrutura das *Brucella* lisa e rugosa, é a ausência de cadeia O no LPS da estirpe rugosa. Esta bactéria possui um lipopolissacarídeo não endotóxico não convencional que confere resistência a ataques antimicrobianos e modula a resposta imunitária do hospedeiro (CARDOSO *et al.*, 2006; GOMES, 2013).

A bactéria causadora da brucelose em búfalos, trata-se do agente etiológico *Brucella abortus*, especialmente o biovar 1. A *Brucella abortus* possui 8 biotipos, no Brasil foram isoladas os seguintes, conforme seu biovar: *B. abortus* biovars 1, 2 e 3 em bovinos, em búfalo foi isolado a partir de um feto de bubalino o biovar 1 (BRICKER; HALLING, 1994; BRASIL, 2006; DIPTEE *et al.*, 2006; MEGID *et al.*, 2005; POESTER, GONÇALVES, LAGE, 2002).

Quanto às características bioquímicas dos micro-organismos isolados, estes não utilizam o citrato como única fonte de carbono, exibem atividade de urease variável, são catalase e oxidase positivos, reduzem o nitrato a nitrito e não são hemolíticos. Produz ácido, mas não de carboidratos em meios convencionais. Não produzem indol e aos testes de Vermelho de Metilo e de Voges-Proskauer eles reagem de forma negativa, sendo que o seu isolamento pode conseguir-se com meios vulgares, como por exemplo, agar-tripticase-soja. Entretanto, há meios seletivos, como exemplo, o meio de Farrell. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C, contudo pode variar entre 20°C a 40°C. O crescimento ocorre com o pH entre 6,6 a 7,4. Colônias de *Brucella* são de crescimento lento e metucioso, geralmente entre 0,5 e 1 mm de diâmetro, levantadas, convexas e com uma borda inteira (FAO, 2015; GOMES, 2013).

3.3 CARACTERÍSTICA EPIDEMIOLÓGICA DA ENFERMIDADE

Dentre as infecções causadas por bactérias do gênero *Brucella* a mais prevalente é a *B. abortus*, sendo um grande problema relacionado à saúde pública. De distribuição mundial, é considerada endêmica no Brasil e é diagnosticada em todos os estados, gerando grandes perdas econômicas ao país (BRASIL, 2006; FREITAS; OLIVEIRA, 2005; OIE, 2015).

A OIE (2015) descreve que os maiores níveis de incidência da Brucelose estão localizados no Oriente Médio, na região do Mediterrâneo, África-subsaariana, China, Índia, Peru e México. Atualmente, o maior número de casos está sendo registrado em países da Ásia Central e do Sul. Acredita-se que vários países da Europa Ocidental e Norte, assim como Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia, já são livres do agente infeccioso.

A carga global da brucelose humana é enorme, o agente provoca mais de 500.000 infecções por ano em todo o mundo (PAPAS *et al.* 2006). Na África, os casos de brucelose são devido à transmissão, através dos animais silvestres e animais de pecuária. (ASSENGA *et al.* 2015; GORSICH *et al.*, 2015).

Os estudos epidemiológicos e programas de saúde são comuns em bovinos e raros em búfalos (SILVA *et al.*, 2014). No Brasil, a brucelose em búfalos vem sendo evidenciada por meios de levantamentos em algumas localidades brasileiras de 2001 a 2015. A frequência de ocorrência variou entre 1,3% a 37,5%, de acordo com a região, a população examinada e os testes laboratoriais empregados no diagnóstico (BASTIANETTO *et al.*, 2005; CASSEB *et al.*, 2015; CHAVES *et al.*, 2012; FUJII *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2009).

Essa enfermidade encontra-se presente na lista da OIE, sendo considerada uma doença com importância para a saúde pública e econômica devido suas consequências significativas no comércio nacional e internacional, sendo motivo de restrições ao mercado internacional (OIE, 2015).

O impacto econômico da brucelose é grande, devido aos prejuízos na saúde animal e na produção de leite e carne. Os efeitos negativos diretos e indiretos da brucelose são difíceis de avaliar (LUNA-MARTÍNEZ; MEJÍA-TERÁN 2002). Devido aos problemas reprodutivos estima-se que a brucelose seja responsável pela diminuição da produção de leite de 20 a 25% (ALVES; VILLAR, 2011).

3.4 TRANSMISSIBILIDADE

Trata-se de uma enfermidade infecciosa grave que acomete os animais domésticos, doença que gera grandes prejuízos à pecuária, de caráter crônico, caracterizada por aborto e infertilidade, acometendo bovinos, bubalinos, suínos, ovinos, caprinos e equinos, sendo considerada uma zoonose, por estar associado a animais que é a sua fonte primária, visto que a brucelose pode ter um perfil epidemiológico diferente, dependendo da espécie hospedeira (FOSGATE et al., 2002a; FREITAS et al., 2000; FREITAS; OLIVEIRA, 2005; MOLINARO, 2009).

A brucelose é uma grave zoonose ocupacional, por acometer profissionais da área agrária, adquirida por penetração do micro-organismo através de lesões (fissuras na pele), membranas mucosas, conjuntiva, respiratórias e gastrointestinais. É também uma zoonose de origem alimentar, a ingestão é sua principal via de transmissão e geralmente ocorre por meio de leite não pasteurizado; ou não fervido, queijo frescal e produtos de carne (carne malpassada), também podem ser transmitidos por contato com anexos fetais, sendo que a exposição percutânea com agulha, a exposição conjuntival através de respingo nos olhos, e inalação são as rotas mais comuns de entrada (BASTOS *et al.*, 2015; BRASIL, 2010; VASCONCELOS, 2006).

Esse agente sobrevive durante períodos prolongados no solo, fezes, dejetos e água, em condições ambientais favoráveis, aumentando as chances de exposição e risco de transmissão (BRASIL, 2006). As particularidades do comportamento bubalino acabam diversificando um pouco a forma de transmissão da brucelose em búfalos em comparação com a brucelose bovina, visto que esses animais têm

hábitos diferentes, dentre esses, observamos o hábito que esses animais tem de banhar-se constantemente, com intuito de fazer a termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em açudes, expondo-se mais a determinados micro-organismos como por exemplo as *Brucella abortus*, pois a sobrevivência desse patógeno neste tipo de ambiente é maior. Outro mecanismo é a forma de criação extensiva, com acesso a extensas áreas, a qual pode lhe proporcionar uma infecção, visto que esse convive com um ecossistema amplo. Além disso, são animais fortes e podem destruir cercas e entrar em contato com outros grupos de animais, aumentando a possibilidade de difusão da doença (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

A transmissão de *B. abortus* em bubalinos ocorre principalmente quando as bactérias são eliminadas a partir de animais infectados em períodos de parto (GORSICH *et al.*, 2015). A fêmea prenhe é uma fonte de infecção, por eliminar grandes quantidades de bactérias nas secreções uterinas, nos fetos abortados e nas membranas fetais seja, parto ou durante o período puerperal. Essa secreção eliminada pela fêmea prenhe contamina pastagens, alimentos e fontes de água, levando os outros animais a serem contaminados pela ingestão de água e alimentos contaminados com o agente ou ainda pelo hábito de lambar e/ou cheirar as crias recém-nascidas. Já transmissão aos bezerros pode ocorrer pela ingestão de leite contaminado ou via transplacentária (BRASIL, 2006).

Na monta natural a brucelose não constitui um risco, quando comparado com a prática da inseminação artificial, pois o sêmen é depositado no útero, escapando das defesas naturais na vagina (MONTEIRO *et al.*, 2006). Uma das formas de eliminação *Brucella* é pelo leite, o patógeno localizar-se nos gânglios linfáticos supra mamário e glândulas mamárias de 80% dos animais infectados e, assim, secreta a bactéria no leite. Elimina também através de secreções uterinas, produtos do abortamento como o feto, placenta, líquido amniótico, membranas fetais ou ainda por corrimento vaginal e urina após aborto ou parto normal, e verticalmente pela via transplacentária. Já eliminação pelo sêmen de touros infectados ocorre em maior quantidade durante a fase aguda da infecção (BRASIL 2006; HAMDY; AMIN, 2002).

Devido às falhas de manejo, nas propriedades classificadas como positivas, os esforços para controlar, eliminar e erradicar a doença têm que ser coerentes e eficientes, para isso, a participação dos produtores e veterinários de campo em orientar os trabalhadores rurais, sobre normas de manejo como destino de restos de abortos, e também da importância do uso dos equipamentos de segurança, é de extrema importância (LUNA-MARTÍNEZ; MEJÍA-TERÁN, 2002). Dessa forma, o risco de transmissão entre espécies pode ser evitado pela rápida remoção de fetos abortados do ambiente (OLSEN; TATUM, 2010).

3.5 RESPOSTA IMUNE

Os macrófagos são a pedra angular do sistema imune inato. Eles detectam organismos infecciosos através de uma infinidade de receptores, para realizar a fagocitose, e preparar uma resposta apropriada para o hospedeiro (ADEREM, 2003).

Durante essas interações, tanto o acolhimento e a tentativa do patógeno para manipular o hospedeiro, usando um mecanismo para maximizar suas respectivas probabilidades de sobrevivência e reprodução, o patógeno pode adaptar-se a diferentes estratégias de patogênese para infectar o hospedeiro. Por outro lado, o hospedeiro pode aplicar uma resposta inata e adaptativa dos mecanismos de defesa do sistema imunológico para lutar contra o patógeno invasor, visto que os fatores de virulência envolvidos na replicação da *Brucella* são estratégias do agente para contornar a resposta imune do hospedeiro (LAPAQUE et al., 2005; LIN; XIANG; HE, 2015).

Assim, logo que ocorre a infecção, as células do sistema fagocitário, por exemplo macrófagos, ligam-se ao agente por meio de receptores específicos ou com a ajuda dos anticorpos opsonizantes, ocorrendo em seguida a interiorização e essa será digerida e suas porções antigênicas serão expostas na superfície celular, permitindo o seu reconhecimento pelos linfócitos T, linfócitos B e pelas moléculas das classes I e II do MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Então após fagocitada a bactéria, vai ser apresentada ao linfócito T por um complexo de

histocompatibilidade conhecido como MHC-II. Assim, o MHC-II é quem denota que a uma resposta específica ativa, a resposta humoral. Quando a bactéria é fagocitada pela célula a um aumento na produção de interferon gama 1 (IFN- γ), o qual informa ao sistema imune que a célula está infectada, a qual precisa ser destruída, e que será preciso produzir clones das células anucleadas, isso com o mecanismo de feedback, já que essa foi apresentada a um MHC-II. (CORBEL, 2006; JARVIS et al., 2002; VELÁSQUEZ *et al.*, 2012).

As duas respostas estão ocorrendo ao mesmo tempo. A proliferação natural de interleucina 4 (IL-4) ou interleucina 10 (IL-10), e o perfil Th2 que é predominante. Esse perfil Th2 (diferenciação em linfócitos Th2) vai dizer para o sistema imune ativar linfócitos B, ativar plasmócitos a produzir anticorpos. Assim os linfócitos específicos estimulados sinalizam para as concretizarem a fagocitose. A fagocitose ocorre por quem há anticorpos opsonizando. Os anticorpos vão opsonizar as bactérias e também vão neutralizar as toxinas liberadas por ela, ou seja, serve como um sinalizador para as células fagocíticas. Essa imunorregulação, ocorre por causa da variação da tríade, assim se o hospedeiro tem um sistema imunológico competente, esse fará o mecanismo de opsonização, ativará a resposta de memória e debelará o processo infeccioso. Entretanto a bactéria pode resistir, por ser intracelular facultativo, pode desenvolver um mecanismo de resistência no momento que for englobada pela célula, ela pode eliminar suas toxinas e expressar sua camada de lipopolissacarídeo (LPS). Podendo evitar o sistema imuni, fazendo uso de vários mecanismos para evitar ou suprimir respostas bactericidas, pois a camada de lipopolissacarídeo (LPS) que tem a capacidade diminuída para ativação pró inflamatória TNF α e citocinas IL1 em comparação com concentrações semelhantes de *Escherichia coli* LPS. Sendo que uma das explicações para a sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos é a capacidade que a *Brucella* tem através da camada de lipopolissacarídeo (LPS) produzir adenina e guanina monofosfato, substâncias que inibem o processo de fusão fagolisossoma (CORBEL, 2006; JARVIS et al., 2002; LAPAQUE *et al.*, 2005; VELÁSQUEZ *et al.*, 2012).

As bactérias patogênicas como a *Brucella* desenvolveram estratégias para persistir por tempo prolongados em células hospedeiras, evitando as respostas imunes do hospedeiro (ARELLANO-REYNOSO et al., 2005).

3.6 PATOGENIA

No campo das doenças infecciosas, o estudo das relações interativas entre patógenos e seus hospedeiros é de extrema importância, sendo que uma doença infecciosa é o resultado de interações intensas entre um agente patogénico e o seu hospedeiro (LIN, XIANG, HE, 2015).

Após atravessar a porta de entrada, o patógeno, pode ser tomado por macrófagos dos tecidos locais e ser conduzido para os gânglios linfáticos regionais seguindo, via linfa ou sangue, para circulação, disseminando por todo o organismo, e essas bactérias serão subsequentemente semeadas em todo o corpo, com tropismo para os órgãos ou tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. Uma vez dentro da corrente sanguínea, os organismos tornam-se rapidamente patógenos intracelulares, pode não apenas infectar macrófagos como se replicar neles (MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007).

Isso ocorre por que as infecções por *Brucella* são normalmente de natureza crônica. Para promover a sua sobrevivência intracelular, o patógeno minimiza a ativação dos mecanismos inflamatórios do hospedeiro (LIN, XIANG, HE, 2015). Diversos estudos sobre fatores de virulência foram dirigidos para os principais componentes da membrana externa, a qual contém a camada de lipopolissacarídeo (LPS), que é o principal fator de virulência para a *Brucella* (CARDOSO et al., 2006).

Esse fator de virulência se dar pela capacidade que a *Brucella* tem através da camada de lipopolissacarídeo (LPS) produzir substâncias que inibem o processo de fusão fagolisossoma, como por exemplo a adenina e guanina monofosfato (VELÁSQUEZ et al., 2012). Outra substância está relacionada com a síntese de cadeias cíclicas (CARDOSO et al., 2006).

Os cíclicos β 1,2glucanas (C β G) sintetizados pela *Brucella*, que fazem parte de um dos constituintes gerais dos envelopes de bactérias Gram-negativas, é importante para contornar as defesas das células hospedeiras. C β G atua em bolsas lipídicas encontradas nas membranas das células hospedeiras. O C β G é assim um fator de virulência que interage com as Bolsas lipídicas e contribui para a sobrevivência do patógeno, isto ocorre por que uma dessas características estruturais do esqueleto poliglucose controla a maturação do vacúolo, evitando a fusão lisossoma, permite que a *Brucella* sobreviva e alcance o retículo endoplasmático, onde ocorre sua replicação, em seguida as bactérias são libertadas com a ajuda de hemolisinas e necrose celular induzida (ARELLANO-REYNOSO et al., 2005; MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007).

3.7 SINAIS CLÍNICOS

Os prejuízos para a bubalinocultura com a brucelose são determinados principalmente por problemas da esfera reprodutiva, afetando negativamente o potencial reprodutivo e produtivo (RADOSTITS et al., 2007; CHAND; CHHABRA; NAGRA, 2015). *Brucella* spp. pode se localizar nas articulações, ossos, tecidos reprodutivos masculinos, ou em outros locais em que a inflamação e patologia associada induzem lesões e sinais clínicos (OLSEN; TATUM, 2010).

São bactérias específicas, pois infectam um determinado tipo de tecido. Essa afinidade tecidual está relacionada com a presença de nutrientes. Devido a dependência nutricional, a *Brucella abortus* necessita do álcool-açúcar eritritol, produzida pela placenta, que está presente em elevadas concentrações nos tecidos uterinos e placentários de alguns animais, logo, esse micro-organismo habita o trato genital devido a essa preferência nutricional (MOLINARO, 2009). O eritritol é capaz de estimular o crescimento da *Brucella abortus*, ocorre em alta concentração na placenta e em fluidos fetais sendo responsável pela infecção nesses tecidos (ALVES; VILLAR, 2011).

As principais características da doença são: aborto (terço final da gestação decorrente de inflamação necrótica na junção entre carúncula e cotilédone), mortalidade perinatal, metrite e, ocasionalmente, esterilidade permanente, retenção de placenta, nascimento de bezerros pequenos e fracos, queda na produção leiteira e infertilidade, ressaltando seu impacto na saúde pública. Contudo, após o segundo aborto, as fêmeas podem não apresentar sinais clínicos, mas continuam a excretar o agente, e são a origem da infecção para as novilhas. Fetos macerados e mumificados são sinais frequentes em búfalos. Em machos, pode ocasionar orquite e processos inflamatórios na vesícula seminal e ampolas (ALVES; VILLAR, 2011; FRASE, 1997; PAULIN; FERREIRA NETO, 2008; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). A maior prevalência da infecção são animais sexualmente maduros, podendo ocorrer em animais de todas as idades (ALVES; VILLAR, 2011).

Andriopoulos *et al.* (2007) relatam 14 anos de experiência com brucelose aguda em humanos na Lakonia, Grécia, onde os pacientes infectados tiveram uma história ocupacional relevante em menos de 20% dos casos. As manifestações clínicas incluíram sintomas não-específicos (febre, mal-estar, suores, artralguas, dor lombar, dor de cabeça), achados como esplenomegalia, envolvimento osteoarticular, linfadenite cervical, hepatomegalia, envolvimento geniturinário (nos homens), colecistite, abscesso de mama, e abdômen agudo.

3.8 DIAGNÓSTICO

Acesso a ferramentas de diagnóstico apropriadas é um componente essencial na avaliação e melhoria da saúde global. Diagnósticos são cruciais para identificar a presença e a causa da doença, tanto em nível individual quanto populacional, avaliando corretamente a natureza da doença, para que seja possível designar um curso adequado de tratamento e o acompanhamento dos efeitos das intervenções quer de forma preventiva ou terapêutica (BURGESS; WASSERMAN; DAHL, 2006).

O diagnóstico laboratorial da brucelose bovina e bubalina baseia-se principalmente no diagnóstico sorológico usando soro e/ou amostras de leite. Existem vários testes sorológicos com desempenho diagnóstico diferente e capacidade de se diferenciar animais vacinados de infectados (CIOCCHINI et al., 2014).

Os testes de diagnóstico para brucelose recomendados pelo PNCEBT são realizados exclusivamente em fêmeas de idade igual ou superior a 24 meses, desde que vacinadas entre 3 e 8 meses com a B19. Segundo Nadir Júnior *et al.* (2012), faz-se necessária vacinar as fêmeas bovinas e ou bubalinas entre 3 e 8 meses com a B19; no pois evita dificuldades na interpretação das provas sorológicas, decorrentes da presença de imunoglobulinas residuais de origem vacinal, o que dificultaria a diferenciação entre vacinados e infectados.

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem; os dois últimos como confirmatórios. Células inteiras da amostra de *B. abortus* 1119-3 são utilizadas na preparação dos antígenos.

Um dos principais procedimentos para o controle e profilaxia e na vigilância epidemiológica da brucelose, é o diagnóstico sorológico, além de ter padrão internacional, pode ser utilizado em grandes rebanhos, custo acessível, boa sensibilidade e especificidade (NADIR JÚNIOR *et al.*, 2012).

3.8.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode ser sorológico ou bacteriológico. O sorológico é através de aglutinação em lâmina, tubo, entre outros. E o bacteriológico é feito através de hemocultura ou por materiais obtidos por meio de biópsia, matérias de aborto, etc. (MOLINARO, 2009).

Identificação do agente é feita através de métodos diretos. Esses métodos incluem o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica, e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR) (BRASIL, 2006). O método de cultura é um teste padrão-ouro estabelecido, assim, o uso desse teste para detecção do micro-organismo *Brucella* em bubalinos e bovinos, é inviável, por se tratar de um teste caro ou impraticável para grandes populações (GORSICH *et al.*, 2015).

O diagnóstico de isolamento e identificação do agente é limitante no quesito de uso em grande quantidade, contudo esse é um diagnóstico fidedigno na brucelose em bubalino, já a caracterização molecular da *Brucella* é promissora, especialmente no uso de leite e produtos de abortamentos para identificação do agente (NADIR JÚNIOR *et al.*, 2012).

Já os testes sorológicos são métodos indiretos e incluem testes de aglutinação (lenta, com antígeno acidificado, do anel em leite), de fixação do complemento, imunofluorescência indireta, imunodifusão em gel (dupla ou radial), ELISA (indireto e competitivo), hemólise indireta e Western blot (BRASIL, 2006). A direta aplicação destes testes de diagnósticos recomendados para gado e utilizados em búfalo é problemática. Isto é porque a sensibilidade e especificidade dos testes variam entre espécies (GORSICH *et al.*, 2015).

Os testes de aglutinação com antígenos tamponados, mais fáceis de executar é o teste de Rosa Bengala (RB) ou o teste de aglutinação em placa com antígeno tamponado (BPA), a diferença entre ambos é a concentração da massa bacteriana onde o BPA possui 11% e o RB 8%, sendo utilizada na produção dos antígenos a estirpe de *B. abortus* 99 ou 1119-3 e para o teste Rosa de Bengala e a 1119-3 para o BPA, (PAULIN *et al.*, 2010). Paulin e Ferreira Neto (2008) relatam em seu trabalho sobre brucelose em búfalos que o BPA se destacou como o melhor teste de triagem para búfalos.

Teste de Soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) corado com Rosa de Bengala é uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado. A leitura revela a presença ou a ausência de IgG1. O teste possui alta sensibilidade sendo um teste de fácil execução (BRASIL, 2006).

O Teste do Anel em Leite (TAL) foi idealizado para ser aplicado em rebanho leiteiro através de misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Usado para detectar rebanhos infectados, como também para se monitorar rebanhos leiteiros livres de brucelose. Entretanto há limitações na presença de leites ácidos, ou leite de animais portadores de mamites como também leite de animais em início de lactação no caso do colostro, esses podem ocasionar resultados falso-positivos (BRASIL, 2006; NIELSEN, 2002).

O Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME) é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, considerada a principal classe de Ig presente em animais infectados por *B. abortus*. O teste possui boa sensibilidade e alta especificidade, pois baseia-se no fato de os anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol, esse teste é mais específico, e o teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT) também chamada de prova lenta é utilizada em associação com o teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina (BRASIL, 2006).

No teste de Fixação de Complemento (FC) no Brasil trata-se de um teste confirmatório, contudo é preconizado para o trânsito e comércio internacional de animais pela OIE. Este teste tem sido empregado em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la. Na brucelose bovina, apesar de a FC detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento onde complexo antígeno-anticorpo ativa o sistema complemento. Teste trabalhoso e complexo, entretanto possui boa sensibilidade e alta especificidade (BRASIL, 2006; NIELSEN, 2002). Outra variação

do FC é o teste de hemólise indireta e a hemólise em teste em gel, entretanto, essas modificações não são aceitas como teste de diagnóstico (NIELSEN, 2002).

O ELISA indireto foi desenvolvido inicialmente para diagnóstico de brucelose humana (NIELSEN, 2002). Este teste ajuda a discriminar entre as reações falso-positivas e a verdadeira brucelose e entre a vacinação e infecção sendo esse de alta sensibilidade, mas eles também são mais vulneráveis às reações não específicas (GODFROID, NIELSEN, SAEGERMAN, 2010). Existem vários protocolos para o teste de ELISA Indireto e esses têm apresentado bons resultados. A maioria dos testes de ELISA indiretos usa a camada de LPS purificadas como antígeno, mas uma boa dose de variação existe no conjugado Ig anti-bovino utilizado, esse teste detecta principalmente IgG ou subclasses de IgG. O teste possui alta sensibilidade; entretanto, sua especificidade assemelha-se àquela do AAT (BRASIL, 2006; SAEGERMAN et al. 2004). A versão do ELISA indireto aprovada pela OIE é o que se utiliza LPS purificados como antígeno, soro diluído 1:50 e um anticorpo monoclonal específico, conjugado IgG bovina (NIELSEN, 2002).

Nos diferentes testes de diagnósticos indiretos, as atividades das imunoglobulinas permitem a distinguir entre infecções agudas e crônicas. Um exemplo disso é a presença simultânea de IgM que é detectada em um teste de aglutinação e a IgG detectada em ELISA indireto, o que sugere uma infecção aguda, enquanto que a infecção crônica é devido a presença de apenas IgG (GODFROID, NIELSEN, SAEGERMAN, 2010).

O Teste de ELISA Competitivo é utilizado com o antígeno imobilizado na fase sólida o lipopolissacarídeo (LPS) de *B. abortus*. O soro a teste com um anticorpo monoclonal específico contra a cadeia "O" do agente. Quanto maior a quantidade de anticorpos anticadeia "O" no soro, maior a competição com o anticorpo monoclonal específico e diminuído assim a cor da reação. É um teste muito sensível e específico, preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal como teste confirmatório para essa enfermidade (BRASIL, 2006).

Sobre os testes de precipitação, temos o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e os testes de Imunodifusão Radial Simples (SRD). Foram os primeiros testes para distinguir anticorpo vacinal do anticorpo resultante de uma infecção por *B. abortus*. Embora estes testes forneçam dados não disponíveis por outros meios, a sua sensibilidade era insuficiente para uso em larga escala de diagnóstico não sendo recomendada pela OIE para diagnóstico da brucelose bovina e bubalina (NIELSEN, 2002).

3.8.2 Diagnóstico clínico

Brucella abortus provoca abortos e redução da fertilidade em búfalos (DIPTEE *et al.*, 2005), sendo presuntivos da doença a campo o abortamento e outros sintomas relacionados com a reprodução tanto em fêmeas quanto em machos. Entretanto o diagnóstico sorológico é o definitivo, pois pode ocorrer alguns sinais clínicos inespecíficos, já no abate, lesões de bursites (bolsas serosas) são associadas com infecção com *Brucella abortus* (FREITAS; OLIVEIRA, 2005).

Em humanos a doença é descrita como manifestações multiformes (PAPAS *et al.*, 2005). Devido a ocasionais apresentações de sintomas não específicos, incomuns e enganosos a brucelose, seja em uma região endêmica ou não, continua a ser de difícil diagnóstico (ANDRIOPOULOS *et al.*, 2007).

Complicações respiratórias por esse agente são consideradas raras, sendo que 16% dos casos incluem pneumonia lobar e derrames pleurais. Em 40% dos casos o sistema ósseo e a articulação são acometidos, sendo esse o primeiro sistema a ser acometido e ocasionando assim osteomielite, artrite periférica, bursite entre outras (CORBEL, 2006; PAPAS *et al.*, 2005). O segundo sistema a ser acometido é o reprodutivo, homens apresentam epididimite e orquite, mulheres apresentam abortos espontâneos no primeiro e no segundo trimestre de gestação (PAPAS *et al.*, 2005).

3.9 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

A brucelose bovina é alvo do programa de controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil, que teve início em 2001. O programa normalmente adota a mesma estratégia para o controle e erradicação de bovino e bubalino. Assim o rebanho bubalino segue a mesmas recomendações de bovinos nos quesitos profilaxia, diagnóstico e controle (BRASIL, 2006).

Por ser zoonose e causar prejuízos à produção de carne e leite, a Brucelose tornou-se um alvo dos programas de controle e erradicação em vários países (NADIR JÚNIOR *et al.*, 2012). Entretanto, programas de erradicação tem alto custo e requerem boa manutenção e uma excelente infraestrutura. Em alguns países, esses programas de brucelose podem ser concebidos para controlar a enfermidade, em vez de erradicá-la (OLSEN; TATUM, 2010).

Segundo Lage *et al.* (2008), o programa de controle e erradicação da brucelose deve estar fundamentado em ações que envolvam identificar e eliminar os animais infectados, indenizando o proprietário com a finalidade de repor o animal descartado, entretanto, ocorre restrições na implantação de um programa neste sentido, principalmente em países subdesenvolvidos, devido à falta de recursos. Desta forma, a vacinação dos animais tem um papel de extrema relevância. A brucelose é difícil de erradicar a partir de uma área, mas pode ser prevenido e controlado, através de vacinação de animais, pois essa medida aumenta a resistência dos animais e interrompe a transmissão do agente sob condições naturais (CHAND, CHHABRA; NAGRA, 2015).

Os estudos sobre vacinação foram realizados em bovinos e foram extrapolados para os búfalos sem a adequada verificação (FOSGATE *et al.*, 2002b), visto que Fosgate *et al.* (2003), verificaram que a vacina comercial RB51 na dose recomendada falhou na proteção de búfalo em infecção após a exposição natural a *B. abortus* biovar 1, não podendo ser utilizada esta vacina nos bubalinos velhos não vacinados com a vacina amostra B19.

Testes convencionais de vigilância para diagnóstico sorológico são baseados primariamente na detecção de anticorpos contra um epitopo imuno dominante da *Brucella*. A identificação de uma resposta humoral é um método válido para determinar se um animal foi exposto ao patógeno, assim a utilização de métodos de diagnósticos sorológicos que combinam testes de triagem (alta sensibilidade, especificidade mais baixa) com exames confirmatórios (alta especificidade, sensibilidade mais baixa) são projetados para detectar animais positivos. Esses métodos são métodos mais econômico e com maior precisão (OLSEN; TATUM, 2010).

A utilização de métodos de diagnósticos sorológicos se faz necessário para identificar os animais infectados no rebanho, ou para os novos animais que estão sendo incluindo no plantel, visto que o controle da enfermidade se baseia na vacinação das bezerras e na eliminação de portadores (RIET-CORREA *et al.*, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado em duas propriedades de búfalas da raça Murrah, voltadas para produção de leite em um município próximo a Salvador - Bahia, distante uma da outra cerca de 30 km, representadas por Propriedades 1 e 2. A região possui precipitação média anual de 1.650 mm, clima chuvoso quente e úmido com ventos moderados.

A **Propriedade 1** conta com 635 ha (hectares), sendo 535 ha em sistema de pastejo rotacionado (20% de *Brachiaria humidícúla*, 78% de *Brachiaria decumbens*, 2% de *Brachiaria arrecta*, cana-de-açúcar e *Brachiaria mutica*), com cerca elétrica para divisão dos piquetes e represas na maioria deles. Conta ainda com sala de pré-ordenha com uma área de 100 m² que recebem os animais provenientes dos piquetes antes das ordenhas, sendo esta estrutura oferecida nas duas propriedades. A sala de ordenha é composta de sistema de ordenha mecânica, com duas linhas de leite com doze lugares de cada lado, com registro automático da produção de leite. O plantel possui 330 animais em lactação, divididos em três lotes de ordenha. Os bezerros permanecem com suas mães pelo período de sete dias, depois tem acesso a elas somente na hora da ordenha para o apoio diário, recebendo em seguida suplementação a base de farelo de trigo. As búfalas recebem após a ordenha, concentrado a base de farelo de trigo, caroço de algodão, farelo de soja, sal mineral e cevada.

A **Propriedade 2** tem 600 hectares sendo 300 ha em sistema de pastejo rotacionado (60% de *Brachiaria humidícúla*, 20% de *Brachiaria decumbens*, 1% de capim elefante; 1% de cana-de-açúcar e 18% de gramíneas tolerantes ao alagamento (*Echinochloa pyramidalis* e *Leersia hexandra*). Tal como a Propriedade 1, utiliza-se a cerca elétrica para divisão das pastagens, possui ainda um rio que corta a propriedade, fornecendo água aos piquetes. O curral possui 700m² de área coberta e 500m² de área descoberta, conta com balança, tronco de contenção e

sistema de ordenha mecânica com balde ao pé, com oito lugares, em duas linhas de ordenha. A propriedade tem 110 animais em lactação, divididos em dois lotes de ordenha. Na propriedade 2, o mesmo manejo alimentar é semelhante ao da propriedade 1, com inclusão de capim elefante e cana de açúcar e sem oferecimento de cevada. A quantidade de alimento oferecida é com base na produção individual de leite. Em ambas as propriedades, as vacas secas alimentam-se de pastagens e recebem o sal mineral em cochos espalhados nos piquetes.

O manejo reprodutivo é semelhante nas duas propriedades e a estação de monta é realizada no período de março a agosto com Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) no período de setembro a fevereiro. Nas propriedades, a idade média à primeira IA ou monta está em torno de 18-24 meses e idade média ao primeiro parto entre 30 a 36 meses. Em ambas as propriedades, a sanidade do rebanho é mantida perante o uso de vacinas e vermífugos. São realizadas duas ordenhas diárias. Nos dois locais de estudo são acompanhados os procedimentos de manejo, como entrada das vacas na sala de ordenha, teste de mastite, pré-desinfecção dos tetos (*pré-dipping*), secagem dos tetos, fixação e retirada das teteiras, desinfecção dos tetos pós-ordenha (*pós-dipping*) e saída das vacas da sala de ordenha.

4.2 ANIMAIS

A primeira fase do trabalho envolve a colheita de soro, estocagem e identificação das amostras. Estas foram agrupadas envolvendo animais Nulíparas e multíparas de até seis lactações. Animais esses da espécie pertencente à família Bovidea gênero *Bubalus bubalis* e da raça *Murrah*. Segundo o padrão racial estabelecido pela Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos - ABCB (2015) os animais da raça *Murrah* possuem a conformação média, apresentam chifres curtos, enrodilhando-se em anéis na altura do crânio, de boa capacidade digestiva, sendo considerada entre as raças bubalinas a melhor produtora de leite. As fêmeas possuem um peso médio de 550kg. Tendo aptidão mista com prevalência para o tipo

leiteiro, é considerado um animal de temperamento dócil. O manejo reprodutivo desses animais é feito por inseminação artificial.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS

Antes da coleta de sangue foi aplicado um inquérito epidemiológico com os seguintes pontos: histórico de abortamento e natimortos, a quantidade de fêmeas na propriedade, sistema de criação e manejo dos animais, principal atividade da propriedade e contato com outros animais. Foram coletadas amostras de sangue de 118 Búfalas (*Bubalus bubalis*), com idades variadas, 59 animais com 24 a 28 meses Nulíparas e 59 animais multíparas, sendo esses vacinados de 3 a 8 meses de idade com a B19. Os animais foram selecionados de forma aleatória.

Realizou-se colheita de sangue por meio de punção venosa (veia coccígea e jugular) das búfalas nas propriedades. O material foi armazenado e levado ao Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia onde foram realizadas as análises. O material foi centrifugado a 1500 rpm (rotações por minuto) por dez minutos. O soro foi armazenado em microtubos devidamente identificados, conservados em uma temperatura de -20°C até sua utilização.

4.4 AAT (ANTIGENO ACIDIFICADO TAMPONADO)

Para a realização do AAT para investigação de Brucelose, utilizou-se o antígeno pertencente a linhagem da *Brucella abortus* 1119-3, na concentração celular de 4%, inativado pelo calor e corado pelo corante Rosa de Bengala, adquirido através da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB). O protocolo foi realizado seguindo recomendação do PNCEBT (BRASIL, 2006).

Os soros assim como o antígeno, foram retirados respectivamente do congelador e da geladeira, colocados à temperatura ambiente por aproximadamente

30 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram organizadas em galeria, identificadas para controle, depois homogeneizadas e, com uma micropipeta, retirou-se 30µl colocados, com uma inclinação de 45°, na placa de vidro. O antígeno foi colocado ao lado, na mesma quantidade (30µl), sem ter contato com o soro. Após esta etapa, fez-se uma homogeneização, podendo contar com a ajuda de um bastão, em movimentos circulares, durante 4 minutos. A leitura foi feita com o auxílio de uma caixa de fundo escuro e a identificação da reação positiva é constatada pela presença de grumos. Devido ao fato deste Teste ser altamente sensível, se constitui em Teste de Triagem.

4.5 ELISA INDIRETO

Para o teste do ELISA foi realizado o protocolo de Maturino (2014), seguindo o ponto de corte de 0,223, recomendado pelo referido autor. A sensibilização das placas de poliestireno de 96 poços, de fundo plano (Corning Costar Corporation Cambridge, USA), foi realizada com antígeno solúvel e em seguida as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão PBS 0,02M, pH 7,2. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µl de solução de albumina bovina a 0,2% por cavidade e incubadas a 37°C, durante 1h. Os soros testes foram diluídos em PBS, pH 7,2 (1:2.000), distribuídos nas placas (100µl/poço) e incubados por uma hora a 37°C. Após a incubação com anticorpo primário, as placas foram lavadas com PBS a 0,05% de Tween 20 e submetidas à incubação com anticorpo secundário espécie específico (anti-IgG conjugado com peroxidase), na diluição 1:10.000. A seguir, foram novamente lavadas e receberam 100µl do substrato cromogênico (orthophenylene-diamine, OPD) diluído em tampão citrato-fosfato a 0,15M, pH 5,0. Passados os 15 minutos, a reação foi bloqueada com 10µl de H₂SO₄, e a leitura realizada em espectrofotômetro de microplacas, com filtro de 490nm.

4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Após a realização dos testes descritos a última etapa foi a tabulação dos dados, que foram tratados estatisticamente pelo percentual simples para verificar a presença do patógeno, onde verificou-se a frequência de búfalas Sororreagentes e Não Sororreagentes através das provas realizadas.

O **cálculo da concordância** foi realizado segundo Mathias *et al.* (1998), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Concordância} = \frac{\text{Positivos em ambos os testes} + \text{negativos em ambos os testes}}{\text{Total de soros testados}} \times 100$$

5 RESULTADOS

Os 118 soros de animais selecionados de forma aleatória, aparentemente apresentavam-se assintomáticos e sem evidência epidemiológica da brucelose, entretanto, nas propriedades havia histórico de aborto no terço final da gestação e nascimento de natimorto o que correspondia a 14% dos nascidos vivos segundo os dados obtidos através do inquérito.

Das 118 amostras analisadas neste experimento todas foram submetidas ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado, a qual nenhuma foi reagente a técnica conforme a figura 1.



FIGURA 1: Amostras de soro de búfalas submetidas à técnica do AAT

As amostras foram submetidas ao método de diagnóstico de ELISA indireto, na qual 82 amostras apresentaram valores de densidade óptica acima do “cut-off” (0,223), valor esse obtido por Maturino (2014), com Absorbância variando entre 0,114 a 0,760 conforme representado na Figura 2. Obteve-se assim um total de 82 amostras reagentes, sendo que destas 58 foram amostras da propriedade 1 e 24 da propriedade 2 e 36 não reagentes, sendo que desse grupo apenas 2 amostras pertenciam a propriedade 1. Visto que os animais mesmo não reagentes ao teste do AAT demonstraram no ELISA indireto um valor significativo de reagentes ao teste.

Duas amostras estiveram mais próximas do valor de corte apresentado um valor de 0,222 e 0,227 o que corresponde na figura 2 às amostras 3 não reagente e 109 reagente, respectivamente. O menor valor de densidade obtido foi referente a uma das amostras não reagente representada pela amostra 44 na figura 2.

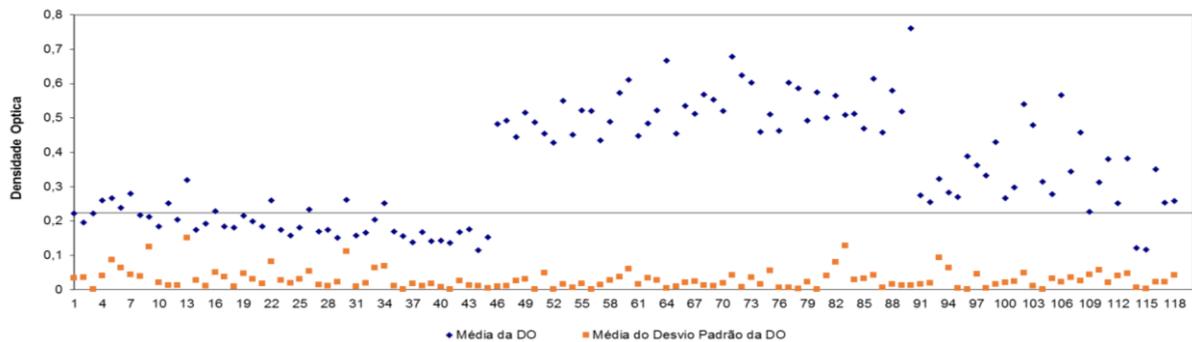


FIGURA 2: Valores de absorbância de soro de búfalas reagentes ao Teste ELISA Indireto.

As amostras submetidas ao teste de Antígenos Acidificado Tamponado e ao Método de ELISA indireto obtiveram-se respectivamente, nenhuma amostra reagente e 69% das amostras reagentes, das não reagentes 100% e 31%. Sendo que a concordância entre os dois testes foi de 30,5%, figura 3.

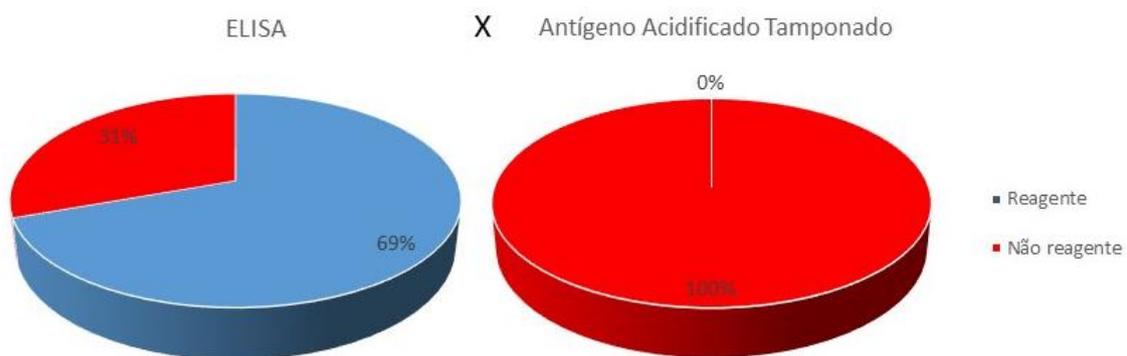


FIGURA 3: Comparação entre os métodos ELISA Indireto e o AAT em soros de Búfalas.

6 DISCUSSÃO

Foi observado que o método de ELISA é amplamente utilizado no diagnóstico sorológico por ser bastante sensível, sendo esse método de fácil manipulação (KUNO, 1987), concordando assim com o resultado apresentado o qual observa-se que o método de ELISA indireto tem melhor desempenho comparado com a técnica do Antígeno Acidificado Tamponado, por detectar mais animais reagentes na espécie bubalina, apresentando ser um método mais sensível que o método do ATT.

Além disso, o ELISA indireto pode ser utilizado na rotina de diagnóstico da enfermidade, em grande população, uma vez que consegue diferenciar animais infectados dos não infectados, contribuindo como formas de diagnóstico (PUTINI, 2008).

Nas análises de Molnár *et al.* (2002) onde fizeram um levantamento sorológico com 440 amostras de soros bubalinos compararam resultados obtidos entre testes sorológicos e obtiveram sensibilidade e especificidade respectivamente 97,14% e 95,66% no ELISA indireto com conjugado contra IgG bovino total, 91,42% e 94% no teste do antígeno acidificado tamponado, o autor relata que o total de amostras positivas e negativas foram semelhantes no ELISA e no AAT, contudo, no AAT 13 amostras foram falso-positivas e 17 falso-negativas. Relata ainda que as amostras falso-positivas e falso-negativas nos testes ELISAs estiveram próximos do valor de corte (resultados incertos ou suspeitos).

Fosgate *et al.* (2002b) descrevem que desempenho de testes sorológicos de diagnósticos para Brucelose varia de acordo com a espécie testada, o que foi observado no trabalho de Molnár *et al.* (2002) onde observa-se que há diferenças entre espécies, visto que em bubalinos o Elisa indireto apresentou-se mais sensível que específico, diferente de alguns resultados encontrados em bovinos e em outras espécies, constituindo-se assim um melhor teste para triagem devido a sua alta sensibilidade.

Jardim et al. (2009) em um estudo de comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado, descreve que o uso do ELISA indireto em rebanho vacinado, aumentaria muito a necessidade de uso de provas confirmatórias para os resultados positivos do ELISA na triagem, porém o uso do ELISA indireto como prova confirmatória aumentaria o sacrifício de animais falso-positivos, isso devido à alta sensibilidade, assim a técnica poderia favorecer a detecção de imunoglobulinas residuais da vacina B19.

Entretanto de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2006), as fêmeas devem ser vacinadas com idade de 3 a 8 meses com vacina B19, assim quando a vacinação ocorre até os 8 meses de idade, tais anticorpos desaparecem rapidamente, e os animais acima de 24 meses são considerados totalmente negativos nas provas sorológicas, lembrando desta forma que os animais separados nas propriedades possuíam idades variadas, sendo 59 animais com 24 a 28 meses Nulíparas e 59 animais múltíparas e acima 4 anos, sendo essas búfalas vacinadas com idade de 3 a 8 meses com a B19.

É importante também se lembrar de que o manejo reprodutivo nas propriedades durante a estação de monta é realizado com Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), observando-se assim o risco em relação a Inseminação Artificial, onde o sêmen é depositado diretamente no útero, escapando das barreiras naturais (MONTEIRO et al., 2006). Tendo assim a possibilidade desses animais estarem contaminados devido a esse tipo de manejo. Pois os prejuízos para a bubalinocultura com a brucelose são determinados na área reprodutiva, causando grande perda para o produtor (RADOSTITS et al., 2007; CHAND, CHHABRA & NAGRA, 2015). Observou-se nas duas propriedades sintomatologia de perdas reprodutivas tendo um percentual 14% de abortos e natimortos, sendo esses uns dos sinais clínicos da enfermidade. Entretanto, considerando que todos os animais avaliados eram vacinados com B-19 para *Brucella abortus*. É necessário investigar outras causas de indução de abortamentos em bubalinos nas propriedades, pelo índice de abortos revelados.

As particularidades no comportamento bubalino acabam diversificando um pouco a forma de transmissão da brucelose nessa espécie, em comparação com o bovino, visto que esses animais têm hábitos diferentes, como o hábito de se banhar. Observou-se nas duas propriedades a presença de lagos, rios e córregos. Além da forma de criação adotada pelas propriedades que é a forma mais apropriada para a criação dessa espécie, a forma extensiva, dando acesso a extensa área, podendo entrar em contato com outros animais, expondo-o a determinados micro-organismos como por *Brucella abortus* (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

Desta forma, o estudo de novas técnicas de diagnóstico contribuirá para um controle de enfermidades de maneira mais eficiente e mais confiável, assim ver-se necessário a comparação entres elas para verificação de qual possui melhor desempenho no diagnóstico de bubalinos. O teste do antígeno acidificado tamponado na maior parte da literatura vista, é um teste mais sensível do que específico, principalmente nas análise de diagnóstico de *Brucella abortus* para espécie bovina, ou seja, ele tem a capacidade de identificar os indivíduos que foram exposto ao antígeno.

Já o método de ELISA tendo como exemplo Nielsen et al. (2005), em estudo de outras espécies, observa-se que o método apresenta 96,2% sensibilidade e 99,7% especificidade, esse teste é tido como um teste mais específico, ou seja, específico porque tem a capacidade de identificar os indivíduos que são negativos. Maturino (2014) relata que a sensibilidade e especificidade do teste ELISA em amostras de soros bovino, apresentou maior especificidade que sensibilidade mostrado assim que o desempenho de testes sorológicos de diagnósticos para Brucelose varia de acordo com a espécies testada, como visto anteriormente conforme pesquisa de Molnár *et al.* (2002) onde o teste de diagnóstico ELISA Indireto em bubalino apresentou-se mais sensível.

O diagnóstico de triagem para búfalos recomendado pela literatura é o BPAT, que de acordo com Fosgate e colaboradores (2002b) estima que o teste BPAT em búfalos, apresenta uma sensibilidade de 96,3 e uma especificidade de 90,7, sendo

esse um teste de aglutinação com antígenos tamponados, o teste de aglutinação em placa, o qual se difere do Rosa Bengala na concentração da massa bacteriana, visto que esse teste possui melhor desempenho que o Rosa de bengala, conferindo assim um melhor teste para triagem de brucelose em bubalinos.

Entretanto, têm sido relatadas as diferenças de sensibilidades e especificidades de testes sorológicos para a brucelose entre gado e búfalo (MONTAGNARO *et al.*, 2008). Desta forma como foi observado na literatura que o diagnóstico do ELISA Indireto em Búfalos possui maior sensibilidade que especificidade esse pode ser considerado um teste de triagem e deve utilizado junto com uma prova confirmatória.

Diante da diversificação entre as duas espécies, torna-se essencial criar um programa de acompanhamento sorológico de *Brucella abortus* específico para búfalos (SILVA *et al.*, 2014).

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a técnica do ELISA Indireto para teste de diagnóstico em bubalinos é uma boa opção para diagnóstico de triagem pois possui melhor desempenho comparado com o AAT, os animais reagentes podem ser considerados positivos após confirmação desses com o método do 2-Mercaptoetanol (2-ME).

REFERÊNCIAS

ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **The Journal of Infectious Diseases**; 187(Suppl 2): S340–5, 2003.

ALVES, A. J. S.; Villar, K. S. Brucelose Bovina e sua situação sanitária no Brasil. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. **Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 9, n. 2, p. 12–17, 2011.**

ANDRADE, V. J.; Garcia, S. K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.39-45, jan./mar. 2005

ANDRIOPOULOS, P.; Tsironi, M.; Deftereos, S.; Aessopos, A.; Assimakopoulos, G. Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases. **International journal of infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 52-57, 2007.

ARELLANO-REYNOSO, B.; Lapaque, N.; Salcedo, S., Briones, G.; Ciocchini, A. E.; Ugalde, R.; Moreno, E.; Moriyón, I.; Gorvel, J. P. Cyclic β -1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. **Nature immunology**, v. 6, n. 6, p. 618-625, 2005.

ASSENGA, J. A.; Matemba, L. E.; Muller, S. K.; Malakalinga, J. J.; Kazwala, R. R. Epidemiology of *Brucella* infection in the human, livestock and wildlife interface in the Katavi-Rukwa ecosystem, Tanzania. **BMC Veterinary Research** 11:189, DOI 10.1186/s12917-015-0504-8, 2015.

ABCB. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. **Padrão racial**. Disponível em <http://www.bufalo.com.br/murrah.html>. Acesso em 04/12/2015.

BARBOSA, B.; Elisei, C.; Soares, C.O.; Sanches, C.C.; Lauria, I.E.N.; Bastos, R.; Rosinha, G.M.S. Análise da sensibilidade e especificidade do gene virb5 na detecção de *brucella spp.* por pcr em sangue de bovinos. **Bio (In) Formação** 6(6): 6-17, 2013

BASTOS, C. R. **Padronização do teste “dot blotting” e comparação entre testes de diagnóstico de brucelose em bovinos.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

BASTIANETTO, E.; Amaral, F. R.; Carvalho, Oliveira, L.B.; D. A. A.; Leite, R.C. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco - Minas Gerais. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.55-56, jan./mar. 2005

BERNARDES, O. Bubalino cultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose PNCEBT.** Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, Brasília, 188p, 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. 444p.

BRICKER B. J.; Halling S. M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.11, p. 2660-2666, Nov. 1994.

BURGESS, D. C. H.; Wasserman, J.; Dahl, C. A. Global health diagnostics. **Nature**, v. 444, p. 1-2, 2006.

CARDOSO, P. G.; Macedo, G. C.; Azevedo, V.; Oliveira, S. C. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, 5, 13. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>, 2006.

CASSEB, A.R.; Cruz, A.V.; Jesus. I.S.; Silva, S.P.; Negrão, A. M.; Barros Neto, S.; Galindo, G. A.; Tavares, B. B. Soroprevalência da brucelose bovina e bubalina no Estado do Pará. **Veterinária e Zootecnia**, 22(1): 42-45. Mar. 2015.

CHAND, P.; Chhabra, R.; Nagra, J. Vaccination of adult animals with a reduced dose of *Brucella abortus* S19 vaccine to control brucellosis on dairy farms in endemic areas of India. **Tropical animal health and production**, v. 47, n. 1, p. 29-35, DOI 10.1007/s11250-014-0678-2, 2015.

CHAVES, N. P.; Bezerra, D. C.; Santos, L. S.; Sa, J. S.; Santos, H. P.; Pereira, H. M. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesq. Vet. Bras.** 32(2):131-134, fevereiro 2012.

CIOCCHINI, A. E., Serantes, D. A., Melli, L. J., Guidolin, L. S., Iwashkiw, J. A., Elena, S. A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. Microbiol.** doi: 10.1016/j.vetmic.2014.04.014 - 2014.

CORBEL, M.J. **Brucellosis in humans and animals**. World Health Organization, 2006.

DIPTEE, M. D.; Adesiyun, A. A.; Asgarali, Z.; Campbell, M.; Adone, R. Serologic responses, biosafety and clearance of four dosages of *Brucella abortus* strain RB51 in 6–10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology** 109:43–55 doi:10.1016/j.vetimm.2005.07.020, 2006.

DIPTEE, M. D.; Adesiyun, A. A.; Asgarali, Z.; Campbell, M.; Fosgate, G. T.; Evaluation of cell-mediated immune responses and bacterial clearance in 6–10 months old water buffalo (*Bubalus bubalis*) experimentally vaccinated with four dosages of comercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 106:209–220, doi:10.1016/j.vetimm.2005. 02.023, 2005.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Bovine brucellosis. Health, diseases cards.** Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/gemp/avis/B103-brucellosis/mod1/1110-Culture.html>. Acesso:23/09/2015.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>. Acesso em 14 de dezembro de 2015.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae.** 37(1): 1-23, 2009.

FOSGATE, G.T.; Adesiyun, A. A.; Hird, D. W.; Johnson, W. O.; Hietala, S. K.; Schurig, G. G.; Ryan, J.; Diptee, M. D. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine for domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Preventive Veterinary Medicine.** 58:211–225, 2003.

FOSGATE, G.T.; Adesiyun, A. A.; Hird, D. W.; Johnson, W. O.; Hietala, S. K.; Schrig, G. G.; Ryan, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research.** 63:1598-1605, 2002a;

FOSGATE, G. T., Adesiyun, A. A., Hird, D.W., Hietala, S. K., Ryan, J. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffalo of Trinidad. **Vet. Rec.** 151, 272–273, 2002b.

FOSTER, G.; Osterman, B. S.; Godfroid, J.; Jacques, I.; Cloeckaert, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 2688-2693, DOI 10.1099/ijs.0.65269-0, 2007.

FRASER, M.C. **Manual Merck de Veterinária.** 7ªed. São Paulo: Roca, capítulo 11 p.807-810,1997.

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, out./dez., 2005.

FREITAS, J. A.; SILVA, J. A. R.; OLIVEIRA, J. P.; CARVALHO, R. C. F.; CAPELLO, R.; SARRAF, K. Infecção brucélica em animais abatidos para consumo. **O Biológico**, 62 (1):1-3, 2000.

FUJII, T. U.; Kasai, N.; Vasconcellos, S. A.; Richtzenhain, L. J.; Cortez, A.; Souza, S. L. P.; Baruselli, P. S.; Nishi, S. M.; Ferreira, F.; Gennari, S. M. Anticorpos Anti-*Neospora Caninum* e contra outros agentes de abortamentos em Búfalas da Região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, n.2, p.5-9, jul./dez., 2001.

GODFROID, J.; Nielsen, K.; Saegerman, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian medical journal**, v. 51, n. 4, p. 296-305, doi: 10.3325/cmj.2010.51.296, 2010.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, ORNELAS, M.A. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. p. 92-96, 2007.

GOMES, M. J. P. **Gênero Brucella spp**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul –UFRGS. Porto Alegre: Favet, 84 p., 2013.

GORSICH, E. E.; Bengis, R. G.; Ezenwa, V. O.; Jolles, A. E. Evaluation of the sensitivity and specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for diagnosing Brucellosis in African Buffalo (*Syncerus caffer*). **Journal of Wildlife Diseases**, 51(1):9-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/2013-12-334>, 2015.

HAMDY, M. E. R.; Amin, A. S. Detection of *Brucella* Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. **The Veterinary Journal**, 163, 299±305 doi:10.1053/tvjl.2001.0681, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária municipal**, Rio de Janeiro, ISSN 0101-4234, v. 42, p.1-39, 2015.

JARDIM, G. C.; Pires, P. P.; Mathias, L. A.; Kuchembuck, M. R. G. Comparação do ELISA indireto no diagnóstico da brucelose em rebanho bovino vacinado e não vacinado. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 131-142, 2009.

JARVIS B.W., Harris T.H., Qureshi N, Splitter G.A. Rough lipopolysaccharide from *Brucella abortus* and *Escherichia coli* differentially activates the same mitogen-activated protein kinase signaling pathways for tumor necrosis factor alpha in RAW 264.7 macrophage-like cells. **Infect Immun.** 70(12):7165–8, DOI: 10.1128/IAI.70.12.7165–7168.2002, 2002.

KUNO, G., Gomez, I., Gubler, D. J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36: 153-159, 1987.

LAGE, A. P.; Poester, F. P.; Paixão, T. A.; Silva, T. M. A.; Xavier, M. N.; Minharro, S.; Miranda, K. L.; Alves, C. M.; Mol, J. P. S.; Santos, R.L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 202-212. 2008.

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

LIN, Y.; Xiang, Z.; He, Y. Ontology-based representation and analysis of host-*Brucella* interactions. **Journal of Biomedical Semantics**, 6:37, DOI 10.1186/s13326-015-0036-y, 2015.

LUNA-MARTÍNEZ, J. E.; Mejía-Terán, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, 90 19–30, 2002.

MANTUR, BG; Amarnath, SK; Shinde, RS. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. **Indian Journal Medical Microbiology**. 25(3):188-202, 2007.

MARQUES, J.R.F.; SOUZA, J.S.; CAMARÃO, A.P. et al. **O produtor pergunta a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa-CTT. (Coleção 500 perguntas 500 respostas), 2000. 176 p.

MAPA, 2014. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em 20 set. 2014.

MATHIAS, L. A.; et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus Bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3/4, p. 111-114, 1998.

MATURINO, M.P.M. **Levantamento soropidemiológico de brucelose em amostras de bovinos abatidos em matadouros inspecionados no Estado da Bahia**. Bahia, Dissertação de Mestrado Profissionalizante em Defesa Agropecuária - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

MEGID, J.; Albert, D.; Fagliari, J. J.; Paes, A. C.; Listoni, F. P.; Pinto, M. R. A.; Ribeiro, M. G.; Thiébaud, M.; Ueno, T.; Garin-Bastuji, B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **Veterinary Record**. 156, 147-148, 2005.

MOLINARO, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1. **Rio de Janeiro**: EPSJV; IOC, 290p., 2009.

MOLNÁR, L. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 41-44, abr./jun 2002.

MONTAGNARO, S., Longo, M., Mallardo, K., Pisanelli, G., De Martino, L., Fusco, G., Baldi, L., Pagnini, U., Iovane, G. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 125 (1–2), 135–142, 2008.

MONTEIRO, L. A. R.C.; Pellegrin, A. O.; Ishikawa, M. M.; Osório, A. L. A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Brasileira**. 26(4):217-222, out./dez. 2006.

NARDI JÚNIOR, G.; Garcia Ribeiro, M.; Paulin, L.; Mendes Jorge, A. Brucelose em bubalinos: uma revisão com ênfase ao sorodiagnóstico oficial/Brucellosis in buffaloes: a review with emphasis on official serodiagnosis/Brucellosis en búfalo: una revisión con énfasis en el serodiagn stico oficial. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 142-156, 2012.

NARDI JÚNIOR, G.; Genovez, M.E.; Ribeiro, M.G.; Castro, V.; Jorge, A.M. Interference of vacinal antibodies on serological diagnostic of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. **Brazilian Journal Microbiology**. 38:363-368, 2007.

NIELSEN, K.; Gall, D.; Smith, P.; Bermudez, R.; Moreno, F.; Renteria, T.; Ruiz, A.; Aparicio, L.; Vazquez, S.; Dager, A.; Luna-Martinez, E.; Samartino, L. E.; Halbert, G. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. **Small Ruminant Research**, v.56, p.253-258, 2005.

NIELSEN, K.; Smith, P.; Widdison, J.; Gall, D.; Kelly, L.; Kelly, W.; Nicoletti, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, 100:25-30, doi:10.1016/j.vetmic.2003.12.010, 2004.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, 90: 447-459, doi:10.1016/S0378-1135(02)00229-8, 2002.

OIE - Organiza o Mundial de Saúde Animal. **Ficha Informativa da Brucelose**. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-ES.pdf. Acesso em 17/09/2015.

OLIVEIRA, M. C. de S. **Doenças infecciosas em sistemas de produ o de leite**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 34 p. 2006.

OLSEN, S.; Tatum, F. Bovine Brucellosis. **Vet Clin Food Anim** 26 15–27
doi:10.1016/j.cvfa. 2009.10.006, 2010.

PAPPAS, G.; Papadimitriou, P.; Akritidis, N.; Christou, L.; Tsianos, E. V. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infect Dis**. 6: 91–99, 2006.

PAPPAS, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M.; Tsianos, E. Brucellosis. **The New England Journal Medicine**. 352(22):2325-36, June 2, 2005.

POESTER, F. P.; Gonçalves, V. S. P.; Lage, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**. 90:55–62, 2002.

PAULIN, L. M. S.; Samartino, L. E.; Conde, Turilli, S. B.; Ferreira, C. F.; Amaku, M.; Dias, R. A.; Ferreira Neto, J.S. Avaliação de testes sorológicos de triagem para diagnóstico da brucelose bubalina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.4, p.989-992, 2010.

PAULIN, L. M. S.; Ferreira Neto, J. S. BRUCELOSE EM BÚFALOS. **Arquivo Inst. Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.389-401, jul./set., 2008.

PUTINI, V. B., Cruz, R. B.; Santana, G. S.; Jorge, J. S.; Silva, D. L.; Moura, M.; Carminatid, 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. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, 6 (3):361-370, 2008.

RADOSTITS O.M., et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007.

RAMOS, A.A.; WECHSLER, F.S.; VAN ONSELEN, V.J. et al. **PROMEBUL: sumário de touros bubalinos**. Botucatu: UNESP/FMVZ, 39p., (Boletim técnico; 2), 2004.

RIET-CORREA F., Schild A.L., Mendez M.C. Lemos R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2ª ed. Varela, São Paulo. Vol 1, 425p., Vol 2, 573 p, 2001.

SAEGERMAN C., De Waele L., Gilson D., Godfroid J., Thiange P., Michel P., et al. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. **Vet Microbiol.** 100:91–105. doi:10.1016/j.vetmic.2004.02.003, 2004.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3, p. 392-398, 2010.

SETHI, R. K. Buffalo improvement program in India. **Revista Veterinaria**, v.21, Suplemento 1. p.76-82, 2010.

SCHOLZ, H.C.; Hubalek, Z.; Nesvadbova, J.; Tomaso, H.; Vergnaud, G.; Le Flèche, P.; et al. Isolation of *Brucella microti* from soil. **Emerging Infectious Diseases** 14(8):1316-1317, 2008.

SILVA, J. B.; Rangel, C. P.; Fonseca, A. H.; Morais, E.; Vinhote, W. M. S.; Lima, D. H. S.; Silva, N. S.; Barbosa, J. D. Serological survey and risk factors for brucellosis in water buffaloes in the state of Pará, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 46:385–389, DOI 10.1007/s11250-013-0501-5, 2014.

SOUZA, S.L.P. et al. Detecção de anticorpos anti-Neospora caninum e Toxoplasma gondii em soros de bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de São Paulo, Brasil. **Semina**, v.22, p.39-48, 2001.

VASCONCELOS, S. A. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. Situação atual. In: MESQUITA, A. J.; Durr, J. W.; Coelho, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006, v.1, p. 227-239.

VELÁSQUEZ, L. N.; Delpino, M. V.; Ibañez, A. E.; Coria, L. M.; Miraglia, M. C.; Scian, R.; Cassataro, J.; Giambartolomei, G. H.; Barrionuevo, P. *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 7, p. 639-650, 2012.

VIANA, R. B.; Del Fava, C.; Moura, A. C. B.; Cardoso, E. C.; de Araújo, C. V.; Monteiro, B. M.; Pituco, E. M.; Vasconcellos, S. A. Ocorrência de anticorpos Anti-*Neospora caninum*, *Brucella* Sp. e *Leptospira* Spp. em Búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.3, p.453-457, jul./set., 2009.