

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

Autor: Keila Patrícia Cardoso ROCHA¹; Robson Bahia CERQUEIRA²; Maria Vanderly ANDREA³; Pedro Vitor Duarte BRANDÃO⁴; Vinicius Pereira VIEIRA⁵; Lourival Souza SILVA JÚNIOR⁶; Bianca Silva PIMENTEL⁷.

RESUMO: Devido os males provocados pela Brucelose na produção de búfalos, 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. 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

Author: Keila Patrícia Cardoso ROCHA¹; Robson Bahia CERQUEIRA²; Maria Vanderly ANDREA³; Pedro Vitor Duarte BRANDÃO⁴; Vinicius Pereira VIEIRA⁵; Lourival Souza SILVA JÚNIOR⁶; Bianca Silva PIMENTEL⁷.

ABSTRACT: 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. 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

1 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. keila.gbi@gmail.com

2 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. robsonba@gmail.com

3 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. mvander@ufrb.edu.br

4 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. pvdbrandao@hotmail.com

5 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. viniciusvieira.vet@gmail.com

6 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. juniorsouz.14@gmail.com

7 – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia –
UFRB – Cruz das Almas/Bahia – Brasil. biancapimentel05@gmail.com

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). 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, com aumento anual de 18 milhões nos últimos dez anos (FAO, 2015a; SETHI, 2010).

Segundo dados do IBGE, (2015) e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2015a), o efetivo rebanho bubalino brasileiro é de aproximadamente 1,3 milhões de cabeças, o que corresponde a 99,49% do total do rebanho das Américas.

O manejo sanitário desses animais de produção tem a finalidade de impedir que doenças interfiram no desempenho produtivo do rebanho. Várias doenças podem interferir na produção e na qualidade sanitária, tais como: brucelose, leptospirose, entre outras (OLIVEIRA, 2006).

A Brucelose é conhecida como Febre de Malta, Febre Ondulante, Febre Mediterrânea ou Doença de Bang, é 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 cocobacilos 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).

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, 2015b; FOSTER *et al.*, 2007; POESTER *et al.*, 2002; SCHOLZ *et al.*, 2008).

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 *et al.*, 2002).

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).

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).

Assim 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 vê 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.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em duas propriedades de búfalas (*Bubalus bubalis*) 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. 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.

Foram coletadas amostras de sangue de 118 búfalas, 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), o material foi armazenado e levado ao Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 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.

Para a realização do AAT para investigação de Brucelose, utilizou-se o antígeno pertencente à 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.

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.

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:

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

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.

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 no gráfico 1. 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 pertencia 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 no gráfico 1 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 no gráfico 1.

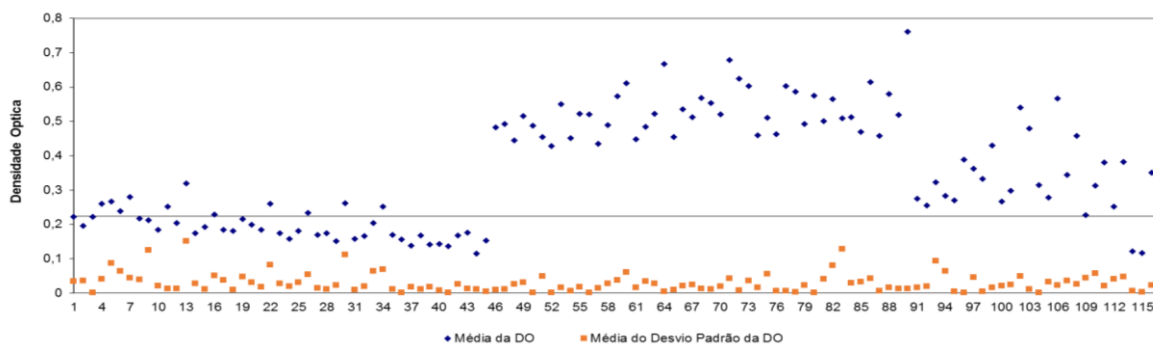


Gráfico 1: Valores de absorbância de soro de búfalas reagentes ao Teste ELISA Indireto.

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%, gráfico 2.

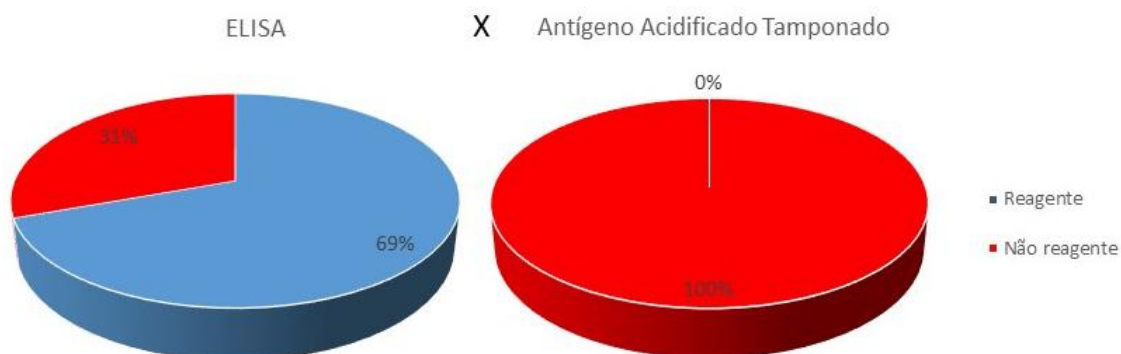


Gráfico 2: Comparação entre os métodos ELISA Indireto e o AAT em soros de Búfalas.

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.* (2002) descrevem que desempenho de testes sorológicos de diagnósticos para Brucelose varia de acordo com a espécies 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 *et al.*, 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 entre 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 expostos 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 espécie 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 *et al.* (2002) 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).

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 BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- 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
- 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
- BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose PNCEBT**. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, Brasília, 188p, 2006.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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:23/09/2015b.
- 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 2015a.

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

OIE - Organização 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 produção 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.

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

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.

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.

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.