

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**NADIA GRANDI BOMBONATO**

**INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE EM PEQUENOS RUMINANTES**

**DOUTORADO**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

NADIA GRANDI BOMBONATO

INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE EM PEQUENOS RUMINANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Veterinárias, da Faculdade de  
Medicina Veterinária, da Universidade Federal de  
Uberlândia, como exigência parcial para obtenção  
do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Monteiro Correia Lima

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B695i Bombonato, Nadia Grandi, 1957  
2017 Investigação de brucelose em pequenos ruminantes / Nadia Grandi  
Bombonato. - 2017.  
92 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.52>  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Caprino - Doenças - Teses. 3. Ovino -  
Doenças - Teses. 4. Brucelose - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

## **INVESTIGAÇÃO DE BRUCELOSE EM PEQUENOS RUMINANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Uberlândia, 04 de agosto de 2017.

---

Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima (Orientadora) – FAMEV/UFU

---

Profa. Dra. Viviane de Souza – EMBRAPA/Sobral - CE

---

Prof. Dra. Karine Cristine de Almeida - UNIPAM

---

Prof. Dra. Camila Rainieri – FAMEV/UFU

---

Prof. Dra. Fernanda Rosalinski Moraes – FAMEV/UFU

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

*À minha família, pelo apoio,  
incentivo e paciência.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por tudo que tenho e tudo que sou.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anna Monteiro Correia Lima, exemplo de ser humano, de pesquisadora e professora, grande amiga e incentivadora, agradeço pelo carinho e compreensão.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e enriquecimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e seus professores.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, pelo incentivo e apoio durante todo o período da pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio, carinho e amizade.

À minha amiga Mariana Assunção, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo incentivo em continuar minha pesquisa e pela amizade incondicional.

Ao amigo Luis Oliveira Lopes, pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU.

A todos os proprietários das fazendas que me receberam e confiaram no trabalho realizado.

Às minhas alunas e estagiárias Gláucia e Lorena, do Laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitários de Patos de Minas - UNIPAM, pelo constante auxílio durante as coletas nas fazendas e processamento das amostras.

A todos da minha família que me incentivaram e torceram por mim, em especial à minha mãe, pelo orgulho que tem ao falar de mim e de minha profissão.

A todos os outros colegas e amigos que direta e indiretamente contribuíram para que este momento se concretizasse.

## RESUMO

Bombonato, Nadia Grandi, 2017. Investigação de brucelose em pequenos ruminantes. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias. UFU. Uberlândia, MG. 92p.

Ao longo das últimas décadas a criação de ovinos e caprinos têm sofrido transformações técnicas nos diversos elos de suas cadeias produtivas. É uma atividade explorada em todos os continentes, sendo exercida em distintos ecossistemas com os mais diferentes tipos de clima, solo, topografia e vegetação. Devido a importância que representam essas criações, cuidados com a sanidade dos rebanhos devem ser tomados, não só pela perda e danos na produção como também pelo controle de enfermidades que podem acometer o ser humano. Dentre essas temos a brucelose, enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a ocorrência da brucelose em duas propriedades de caprinos leiteiros e três propriedades de ovinos de corte na região do Alto Paranaíba, MG. Foram coletadas 48 amostras de sangue e leite de cabras em lactação para o diagnóstico da *B. abortus*, pelo teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Teste do Anel em Leite (TAL). Foi também utilizada a PCR em tempo real para diagnóstico da *B. abortus* e *B. melitensis* no leite desses animais. De 30 ovinos de três propriedades da região foram coletadas amostras de sangue para diagnóstico da *B. ovis*, pelo teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e pela PCR em tempo real. Vinte amostras de sêmen ovino de duas Centrais de Produção e Comercialização de Semen foram analisadas pela PCR em tempo real para também verificar a presença de *B. ovis*. Para o teste do TAL no leite caprino, todas as 48 amostras foram negativas, já para o teste do AAT, uma fêmea caprina foi positiva, mostrando que a *B. abortus* pode ocorrer também em caprinos. No diagnóstico pela PCR em tempo real todas as amostras de leite mostraram resultado negativo para *B. abortus* e *B. melitensis*. Das 30 amostras de sangue ovino para o teste do IDGA, 3(10%) foram positivas e confirmadas pela PCR em tempo real. Apesar da baixa ocorrência da *B. abortus*, e a não ocorrência da *B. melitensis* nos caprinos investigados, deve sempre haver um monitoramento dos rebanhos visto a importância zoonótica dos agentes. Quanto a *B. ovis*, devido aos problemas graves que causa na reprodução dos ovinos, os exames devem ser feitos rotineiramente.

**Palavras-chave:** caprinos, ovinos, *Brucella ovis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*.

## ABSTRACT

Bombonato, Nadia Grandi, 2017. Investigation of brucellosis in small ruminants. Doctoral thesis in Veterinary Sciences. UFU. Uberlândia, MG. 92p.

Over the last decades, sheep and goat farming has undergone technical transformations in the various links of its productive chains. It is an activity explored in all the continents, being exerted in distinct ecosystems with the most different types of climate, soil, topography and vegetation. Due to the importance of this animal's productions, care for the health of herds must be taken, not only for the loss and damages in the production, but also for the control of diseases that can affect the human being. Among these we have brucellosis, an infectious contagious disease, caused by bacteria of the genus *Brucella*. Thus, the objective of this research was to investigate the occurrence of brucellosis in two properties of dairy goats and three properties of sheep for meat production in the Alto Paranaíba, MG region. Forty-eight blood samples and lactating goats' milk were collected for the diagnosis of *B. abortus*, by the Acidified Buffered Antigen (ABT) and Milk Ring Test (MRT). Real-time PCR was also used for the diagnosis of *B. abortus* and *B. melitensis* in the milk of these animals. Blood samples were also collected from 30 sheep of three properties in the region, for diagnosis of *B. ovis* by the IDGA test and real-time PCR. Twenty samples of sheep semen from two Semen Production and Marketing Centers were analyzed by real-time PCR to also verify the presence of *B. ovis*. For the Ring Test in goat milk, all 48 samples were negative, whereas for the ABT test, a caprine female was positive, showing that *B. abortus* can also occur in goats. In the diagnosis by real-time PCR, all the milk samples showed negative results for *B. abortus* and *B. melitensis*. From 30 sheep blood samples for the IDGA Test, 3 (10%) were positive and confirmed by real-time PCR. Despite the low occurrence of *B. abortus*, and the non-occurrence of *B. melitensis* in the goats investigated, there should always be a monitoring of the herds, considering the zoonotic importance of the agents. As for *B. ovis*, due to the serious problems it causes in sheep breeding, examinations should be done routinely.

**Key-words:** Goats, sheep, *Brucella ovis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*.

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 2**

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella abortus*.....42

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella melitensis*.....43

### **CAPÍTULO 3**

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella ovis*.....55

### **CAPÍTULO 4**

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella ovis*.....65

Tabela 2. Frequência de ovinos reagentes (valores relativos e absolutos) na pesquisa de anticorpos anti-*Brucella ovis* pelo teste de IDGA e PCR em tempo real, na região do Alto Paranaíba, MG.....68

## SUMÁRIO

Capítulo 1 – Considerações Gerais.....	10
1. Introdução.....	11
2. Objetivo.....	13
2.1 Objetivos gerais.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Revisão de Literatura.....	14
3.1 A importância da produção de ovinos e caprinos .....	14
3.2 Brucelose.....	16
3.2.1 <i>Brucella abortus</i> .....	717
3.2.2 <i>Brucella melitensis</i> .....	19
3.2.3 <i>Brucella ovis</i> .....	21
3.3 Diagnóstico.....	23
Referências.....	26
 Capítulo 2 – Detecção de <i>Brucella abortus</i> e <i>Brucella melitensis</i> em leite caprino pela PCR em tempo real .....	37
 Capítulo 3 – Investigação de <i>Brucella ovis</i> por PCR em tempo real em sêmen ovino comercial.....	50
 Capítulo 4 – Investigação da ocorrência de infecção por <i>Brucella ovis</i> em rebanhos ovinos.....	59
 Capítulo 5 – Considerações finais.....	73
 AnexoI – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	74

Anexo II – Normas da Revista Ciéncia Rural para submissão do artigo: Investigação da ocorrência de infecção por <i>Brucella abortus</i> e <i>Brucella melitensis</i> em rebanhos caprinos .....	75
Anexo III – Normas da Revista Semina: Ciéncias Agrárias para submissão do artigo: Investigação de <i>Brucella ovis</i> por PCR em tempo real em sêmen ovino comercial.....	80
Anexo IV – Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira para submissão do artigo: Investigação da ocorrência de infecção por <i>Brucella ovis</i> em rebanhos ovinos.....	83

## **Capítulo 1- Considerações Gerais**

## 1. Introdução

O crescimento significativo da exploração de pequenos ruminantes está transformando o cenário dos sistemas produtivos no mundo. Ao longo das últimas décadas a criação de ovinos e caprinos têm sofrido transformações técnicas nos diversos elos de suas cadeias produtivas. É uma atividade explorada em todos os continentes, sendo exercida em distintos ecossistemas com os mais diferentes tipos de clima, solo, topografia e vegetação. Porém, apenas em alguns países a atividade possui expressão econômica e assim como no Brasil é desenvolvida de forma empírica com baixos níveis tecnológicos (CORREIA, 2016).

De acordo com dados do IBGE, o rebanho nacional de caprinos atingiu 9,78 milhões de cabeças em 2016 apresentando uma variação positiva de em relação a 2015. O Nordeste detém o maior efetivo de caprinos, sendo responsável por 92,7% do total da espécie no País. O efetivo de ovinos foi de 18,45 milhões em 2016, com pouca variação em relação a 2015. A Região Nordeste se destaca na criação de ovinos e concentrou 60,6% do rebanho nacional no último ano. A Região Sul figura em seguida, representando 26,5% do efetivo da espécie, acompanhada pelas Regiões Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (3,8%) e Norte (3,6%) (IBGE, 2016).

Os produtos originados da ovinocaprinocultura, carne, leite e pele, têm crescente procura e aceitação no mercado interno e externo, e para atender à demanda de mercado, começam a ser observadas mudanças nos segmentos de produção e comercialização, com o surgimento de criadores cada vez mais especializados na caprinocultura de corte ou leite e na ovinocultura de corte. O abastecimento dos mercados urbanos de carne, leite e seus derivados constitui o foco principal da atividade, onde a carne assume uma posição de destaque ao ser comercializada em ambientes especializados a preços compensadores. Porém, verifica-se que no mercado interno ainda não há a fiscalização adequada para que os produtos comercializados sejam idôneos.

Devido a importância que representam essas criações, cuidados com a sanidade dos rebanhos devem ser tomados, não só pela perda e danos na produção como também pelo controle de enfermidades que podem acometer o ser humano.

Dentre as enfermidades que acometem pequenos ruminantes temos a brucelose com caráter zoonótico e uma das mais difundidas no mundo. É causada pelo gênero *Brucella* onde cada uma das espécies possui seus hospedeiros preferenciais entre os animais domésticos. A *Brucella abortus* em bovinos, *B. melitensis* em caprinos e ovinos, *B. ovis* em ovinos e *B. canis* em cães. A *Brucella melitensis* é considerada a mais patogênica para o ser humano e

considerada endêmica em várias regiões no mundo e em alguns países da América Latina, porém ainda não encontrada no Brasil.

A infecção por bactérias do gênero *Brucella* spp. é uma das causas mais importantes de problemas reprodutivos em animais domésticos, e as perdas econômicas geradas pela brucelose vão além dos problemas reprodutivos, como barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal (carne, leite e derivados) e perdas para as indústrias devido a condenação dos mesmos, além de gastos com programas de controle, erradicação e pesquisas (JARDIM et al., 2006).

Considerando o número reduzido de rebanhos de pequenos ruminantes na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais, um levantamento sobre ocorrência das espécies de *Brucella* que acometem esses hospedeiros é muito importante, não só para o conhecimento do estado sanitário dos animais e controle da enfermidade, como também na minimização da doença em humanos.

## **2. Objetivo**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a ocorrência da brucelose em caprinos e ovinos em propriedades na região do Alto Paranaíba, MG.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar a ocorrência de anticorpos anti *Brucella abortus* em rebanhos caprinos leiteiros utilizando o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).
- Identificar a ocorrência de anticorpos anti *Brucella abortus* em amostras individuais de leite caprino pelo Teste do Anel do Leite (TAL).
- Investigar a presença do DNA de *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* em leite caprino com o uso de marcadores moleculares padronizados para identificação dos agentes por meio da PCR em Tempo Real.
- Investigar a presença do DNA de *Brucella ovis* em sêmen ovino comercial com o uso de marcadores moleculares padronizados para identificação do agente por meio da PCR em tempo real.
- Identificar a ocorrência de anticorpos anti *Brucella ovis* e de DNA por meio da PCR em tempo real em ovinos.

### **3. Revisão de literatura**

#### **3.1. A importância da produção de ovinos e caprinos**

Os caprinos foram os primeiros animais domesticados pelo homem, há cerca de dez mil anos, a produzirem alimentos. Vêm acompanhando a história da humanidade com registro em relatos históricos, porém apesar disso teve poucas vezes seu valor reconhecido. Produzem leite, carne, couro e esterco, além de ter utilidade como animal de tração e ainda hoje os caprinos tem um papel fundamental como fornecedores de alimentos em países ou regiões em desenvolvimento (RIBEIRO, 1997).

A caprinocultura leiteira encontra-se bastante avançada em países como França, Canadá, Espanha, Suíça, Inglaterra e Itália, e especialmente na França, Espanha, Suíça, Inglaterra e Itália, que apresentam um consumo de 6,5 litros de leite por habitante ano, porém 75% do total produzido destina-se a produção de queijos. Nos países como Canadá e África do Sul concentra-se a produção de leite em pó. Esse fato proporciona aos governos a adoção de políticas públicas que visem o desenvolvimento do mercado interno dos produtos de origem caprina e ovina que apresenta um grande potencial (CARVALHO, 2014).

No Brasil, a produção de leite de cabra não ocorre somente na região Nordeste, havendo outras bacias leiteiras já sedimentadas nas regiões Sudeste e Sul do país. O desenvolvimento da caprinocultura leiteira no contexto brasileiro ocorre de acordo com o sistema de produção utilizado (SILVA et al., 2012). Mais da metade do rebanho nacional (52,61%) é composta por animais leiteiros, porém, sua produção é pouca expressiva, estando em 21º lugar (0,93%) na produção mundial. Apesar disso, dados sobre a produção leiteira revelam que o Brasil se configura como maior produtor de leite de cabra da América do Sul, com 150.000 t/ano (FAO, 2014).

Apesar da cidade de São Paulo se tratar de um grande e potencial centro consumidor, o consumo tanto de derivados quanto de leite de cabra é restrito, devido principalmente ao desconhecimento e à falta de costume da população. Porém, os consumidores ressaltam que há potencial de elevação no consumo de ambos, desde que haja maior disponibilidade, informação sobre o produto, além de um preço mais acessível para o consumidor final (LIMA et al., 2015).

As primeiras espécies domesticadas pelo homem foram os ovinos e sua criação possibilitava produção de alimento, principalmente carne e leite e ainda proteção pelo uso de lã contra intempéries do ambiente. A ovinocultura está presente em praticamente todos os

continentes, isto devido principalmente ao seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. Esta criação está destinada à exploração econômica e também à subsistência de famílias em zonas rurais. Na Europa a criação de ovinos ocorre de forma intensiva com rebanhos produtores de carne e leite, destinados à fabricação de queijos especiais, e na América do Sul as criações ocorrem em sistemas de confinamento e pastagens naturais com rebanhos de raças mistas que produzem lã e carne de qualidade para o mercado internacional (VIANA, 2008).

A criação de ovinos e caprinos no Brasil ainda tem um longo período a percorrer para conquistar seu próprio mercado nas diversas regiões onde é praticada e se credenciar a uma maior participação no mercado nacional e, até mesmo, no internacional. No entanto, terá que satisfazer os pré-requisitos de aumento de produtividade e da melhoria da qualidade de seus produtos. São objetivos difíceis, mas possíveis de atingir, desde que trabalhados simultaneamente com a melhoria nos padrões de gerenciamento das unidades produtivas e maior articulação entre os diversos componentes da cadeia produtiva (GUIMARÃES FILHO; ATAÍDE JUNIOR, 2009).

Destacam-se como fatores limitantes para o desenvolvimento desse comércio a irregularidade no fornecimento dos produtos de origem caprina e ovina, visto que a exigência do mercado se dá principalmente no fornecimento fixo desses produtos durante todo o ano sem períodos de sazonalidade. Tem-se ainda o abate clandestino desses animais que agem competitivamente com frigoríficos industriais e também os elevados preços comerciais praticados no mercado que reduz a competitividade de outros produtos concorrentes (CARVALHO, 2014).

A oferta de carnes de ovinos e caprinos oriundos de frigoríficos certificados por serviços de inspeção federal ou estadual é uma vantagem que conota para o crescimento da demanda, haja vista que esses órgãos regulamentam e certificam o elevado padrão de qualidade sanitária do produto com consequente aumento da confiabilidade do mercado em consumir esse alimento (SEBRAE/RN, 2001).

No Brasil o número efetivo de ovinos teve um aumento de 3,4% em 2010 comparativamente a 2009 (IBGE, 2010). Dentro deste cenário a ovinocultura destaca-se no cenário nacional por apresentar grande potencial de crescimento chegando a um rebanho com mais de 18 milhões de cabeças (BRASIL, 2015).

Diferentemente dos maiores países criadores de ovinos e caprinos, o Brasil possui condições edafoclimáticas altamente favoráveis nesse segmento, porém, essa atividade no Nordeste ainda não se enquadrou como cadeia produtiva dentro do enfoque do agronegócio, pois ainda é considerada pelos produtores como uma atividade secundária e pobre, enquanto

criadores dos outros países orgulham-se e lucram com os produtos e subprodutos advindos dessa atividade (NETO, et al. 2007).

### 3.2. Brucelose

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Em muitos países, apresenta-se na forma endêmica resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção e sérias implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico (BRASIL, 2006). Pode ser veiculada ao homem pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e derivados que não passaram por processamento térmico, e transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados, fetos abortados ou anexos fetais, além da própria manipulação de carcaças e vísceras no abate sanitário. As principais manifestações clínicas são as febres recorrentes, fraquezas, dores musculares, distúrbios nervosos e sudorese, podendo levar à incapacidade parcial ou total ao trabalho (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

De acordo com a Organização Internacional de Epizootias (OIE) a brucelose é classificada como doença da lista B, onde estão incluídas as enfermidades que têm importância socioeconômica e/ou para saúde pública e consequências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2002).

O agente etiológico da brucelose é uma bactéria intracelular facultativa e Gram negativa, cocobacilos curtos e pequenos que medem 0,6 a 1,5 $\mu$ m por 0,5 a 0,7 $\mu$ m de dimensão, aeróbia, imóvel, não produz cápsula, flagelos ou esporos, pertencem ao gênero *Brucella* da classe Proteobacteria (PROBERT et al., 2004). São microrganismos aeróbios, porém uma atmosfera com tensão de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> favorece o isolamento de algumas espécies. Apresentam temperatura de multiplicação na faixa de 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo de 6.6 a 7.4 (OIE, 2009).

Cada espécie ou biovar de *Brucella* tem seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (ratos do deserto) (BANAI; CORBEL, 2010; BRASIL, 2006), as quais são subdivididas em sete biovaras para *Brucella abortus* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) três para *B. melitensis* (1, 2 e 3) e cinco para *B. suis* (1, 2, 3, 4 e 5), *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* e *B. inopinata*, onde os membros do gênero possuem potencial zoonótico, embora a patogenicidade seja bastante variável para o ser humano (MORENO et al., 2002; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008; BANAI; CORBEL,

2010).

As bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos, denominadas lisas, que possuem em sua parede celular externa lipopolissacarídeo liso (LPS) ou rugosas, que contêm em sua superfície externa o lipopolissacarídeo rugoso (LPR) e antígenos proteicos (NIELSEN et al., 2004; CARDOSO et al., 2006; POESTER et al., 2010).

As espécies *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. neotomae* normalmente apresentam morfologia de colônia lisa e quando sofrem mutações para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Já as espécies *B. canis* e *B. ovis* apresentam morfologia de colônia predominantemente do tipo rugosa (ALTON et al., 1988; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; MINHARRO, 2009; POESTER et al., 2010).

A capacidade de penetração do agente pela pele íntegra ou lesada e pelas membranas mucosas, além da formação de aerossóis, predispõe os tratadores, veterinários, laboratoristas, trabalhadores de matadouros, frigoríficos e entrepostos de leite ao risco de infecção (LAGE et al., 2008).

A transmissão entre pessoas, apesar de possível, é considerada insignificante sob o ponto de vista epidemiológico, apesar de relatos de casos de transmissão por meio de transfusão de sangue, transplante de medula e relação sexual (GODFROID et al., 2005; MINHARRO, 2009).

### **3.2.1 *Brucella abortus***

A *Brucella abortus* é o agente etiológico da brucelose em bovinos e responsável por uma importante causa econômica de abortos em rebanhos (OSLEN; TATUM, 2010). O agente também pode acometer outras espécies como búfalos, bisões e alces representando um risco importante na manutenção do agente na população animal com especial importância em áreas onde animais selvagens e rebanhos bovinos vivem juntos (GODFROID, 2002). Equídeos, suínos, ovinos, caprinos e cães também podem ser infectados pela *B. abortus*. Geralmente não é transmitida aos suínos, porém quando ocorre se apresenta como infecção transitória, podendo servir de fonte de infecção para bovinos. Em ovinos e caprinos a infecção ocorre ocasionalmente, sendo os ovinos mais resistentes que caprinos. Nos ovinos pode causar epididimite e nos caprinos aborto (CARTER, 1991). Infecções em animais selvagens podem dificultar a erradicação em rebanhos bovinos. Além do mais, a *B. abortus* é um patógeno em humanos associado ao consumo de produtos lácteos oriundos de rebanhos infectados (SELEEM, 2010).

Dentre outras brucelas a *B. abortus* é a de maior prevalência nos casos de brucelose no Brasil, seguido pela *B. suis* em suínos. Já a *Brucella melitensis* e *B. neotoma* ainda não foram isoladas no país (POESTER et al., 2002).

A infecção causada pela *B. abortus* ocorre pelo contato do agente com qualquer mucosa do animal suscetível, principalmente a mucosa oral (THOEN et al., 1993). Depois da penetração no organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias vão se alojar em vários órgãos, principalmente do sistema linfático (EAGLESOME; GARCIA, 1992; THOEN et al., 1993).

A permanência e a disseminação da *B. abortus* no organismo se dá devido a capacidade da mesma sobreviver dentro de macrófagos (GORVEL; MORENO, 2002). O curso da doença depende do estágio fisiológico do animal. Os animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção. Caso o animal não esteja gestante, a *B. abortus* geralmente infecta linfonodos e glândula mamária (CRAWFORD et al., 1990). Estando o animal gestante, as bactérias atingem o útero, local pelo qual possuem grande tropismo, provocando assim o aborto (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993).

Geralmente na primeira gestação após a infecção, ocorre o aborto, porém o mesmo é muito menos frequente na segunda gestação após infecção e raro a partir da terceira gestação (THOEN et al., 1993; CORBEL et al., 2006). De acordo com Thoen et al., (1993) isso ocorre devido ao desenvolvimento de uma resposta imune, principalmente celular, pelos animais, que diminui a área e a intensidade das lesões. Dessa forma a manifestação clínica passa a ser a presença de natimortos ou o nascimento de bezerros fracos.

Após a infecção, a principal manifestação clínica é o aborto (terço final da gestação), onde nos rebanhos com infecção crônica, quase sempre acontece nas fêmeas primíparas e nos animais sadios recentemente introduzidos (BRASIL, 2006).

Nas fêmeas causa placentite necrótica, retenção de placenta, corrimundos vaginais, endometrites, mastites (PACHECO, 2007). Os machos apresentam aumento de volume testicular, uni ou bilateral além das ampolas e vesículas seminais. Pode haver atrofia do órgão afetado devido à reação inflamatória do tipo necrosante, levando a quadros de subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (GORVEL; MORENO, 2002; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

No aparelho locomotor, podem ser observadas infecções articulares, bursites, espondilites em vértebras torácicas e lombares, podendo atingir medula óssea e tendões (GUIDO; GRASSO, 2005). Não há nenhuma lesão patognomônica da brucelose no feto abortado, mas, com frequência, observa-se broncopneumonia supurativa (PAULIN;

FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006). Os inchaços nas articulações dos joelhos e jarretes, conhecidos como higromas, também apresentam evidência de brucelose (RADOSTITIS et al., 2007; LAGES et al., 2008).

No começo da década de 1990, o Estado de Minas Gerais iniciou uma campanha de vacinação obrigatória de bezerras com a vacina B19 em todo o estado. Além de Minas Gerais, o único estado que possuía um programa de vacinação, apesar de haver diminuído os índices de cobertura vacinal nos últimos anos, era o Estado do Rio Grande do Sul (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Em 2016, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu por meio da IN nº 19, 10/10/2016 o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT e a Classificação das Unidades da Federação de acordo com o grau de risco para as doenças brucelose e tuberculose, assim como a definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com a classificação, na forma desta Instrução Normativa (MAPA, 2016).

Alguns Estados, como o Mato Grosso, apresentaram aumento da prevalência quando comparado aos dados do último diagnóstico de situação em nível nacional, realizado em 1975. É relevante a diminuição significativa da prevalência da doença em alguns estados como Minas Gerais, proporcionada pela campanha de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinhas com vacina B19 iniciada em 1993 (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

### **3.2.2 *Brucella melitensis***

O principal agente etiológico da brucelose em caprinos e ovinos é a *Brucella melitensis* e também o principal agente responsável pela brucelose humana, conhecida como febre de Malta. Aborto e infertilidade são os sinais clínicos predominantes em pequenos ruminantes. Embora haja escassez de estudos específicos, ela é reconhecida como fonte de perdas econômicas em ambas as espécies. A sua incidência é muito alta em países do sul e leste da União Européia e em vários outros com baixa renda. Isto afeta países que possuem mais do que 70% de propriedades pecuárias suscetíveis, tornando a brucelose de importância internacional (FAO, 2006).

A infecção por *B. melitensis* em pequenos ruminantes tem sido tradicionalmente negligenciada, pois a produção de ovinos e caprinos representa geralmente uma atividade de baixa renda, praticada por pequenos produtores de áreas rurais menos relevantes no

desenvolvimento mundial. Devido a esses sistemas de produção serem usualmente nômades, o controle e erradicação desta infecção são extremamente difíceis. A distribuição da doença é praticamente mundial e vários países estão sofrendo uma reemergência desta doença em caprinos e ovinos e consequentemente também em humanos (WHO, 2005). A brucelose em caprinos e ovinos é considerada uma doença de menor importância no Brasil, pois a *B. melitensis* ainda não foi diagnosticada no país (SELEEM et al., 2010; POESTER et al., 2002).

Em caprinos a infecção por *Brucella melitensis* é similar à infecção causada por *B. abortus* em bovinos (MEGID et al., 2016). Nos pequenos ruminantes, a infecção por *B. melitensis* causa doença apenas em animais sexualmente maduros e animais jovens podem ser infectados, porém não mostram nenhum sinal clínico, e a resposta sorológica é fraca e transitória (ALTON, 1990). A *B. melitensis* (biovar 1, 2 ou 3), principal agente causador brucelose em ovinos e caprinos, infecta caprinos causando uma infecção generalizada que pode persistir por anos. Nas cabras prenhas a bactéria se multiplica no útero e glândula mamária (RODOLAKIS, 2014).

O aborto no terço final da gestação é o sinal mais evidente, na infecção por *Brucella melitensis*, mas pode haver um surto de abortos, seguido por um período de resistência do rebanho, no qual eles não ocorrem. Em infecções experimentais ocorrem sintomas caracterizados por febre, depressão, perda de peso e às vezes diarréia. Estes sinais podem ocorrer também em surtos agudos e naturais e serem acompanhados por mastite, claudicação, higroma e orquite, placentite e queda na produção de leite em cabras e ovelhas. Muitas vezes, a infecção por *B. melitensis* acomete um grupo de animais, sem apresentar sinais evidentes (BLOOD, 1991; OIE, 2004; MEGID et al., 2016).

Apesar da *Brucella melitensis* ser transmitida congenitamente via útero, cabritos e cordeiros se infectam principalmente pelo leite e colostro. A orquite e epididimite em ovinos e caprinos podem ocorrer, mas não são comuns (MEGID et al., 2016).

Nos países do Sudeste da Europa e do Mediterrâneo a incidência da brucelose causada pela *B. melitensis* em caprinos e ovinos é alta, e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a brucelose é considerada uma das sete doenças negligenciadas e subnotificadas (DONEV, 2010). A doença é reemergente em locais anteriormente controlados, como Malta e Omã. Também ocorre no Oriente Médio, Ásia Central, ao redor do Golfo Pérsico e alguns países da América Central (MEGID et al., 2016).

A incidência global da brucelose em humanos não é bem conhecida devido à poucos dados registrados e grandes variações existentes entre as diferentes áreas

geográficas, mesmo dentro de um mesmo país. Assim, devido à deficiência nos Serviços de Saúde de vários países onde a brucelose é endêmica, não há dados reais no estado global da doença em humanos. A razão desta alta prevalência ocorre devido a fatores socioculturais, agravada pela falta de medidas de controle a serem aplicadas em sistemas de produção de pequenos ruminantes. O contato com animais e exposição ocupacional, assim como os hábitos alimentares, e falta de medidas de higiene, representam os fatores de risco para a infecção de humanos por *B. melitensis* (PAPPAS, 2006).

### 3.2.3 *Brucella ovis*

A brucelose ovina é uma doença infecto-contagiosa de distribuição mundial causada pela *Brucella ovis*. É um micro-organismo não zoonótico, intracelular facultativo que coloniza células do sistema macrocítico linfocitário, provocando doença crônica em ovinos, conhecida como Epididimite Contagiosa dos Carneiros ou Epididimite Ovina. (BURGUESS, 1982; QUISPE et al., 2002).

Apesar de considerada de menor relevância quando comparada às outras bactérias do mesmo gênero, devido ao fato de não ser zoonótica, a *B. ovis* tem sua importância relacionada aos prejuízos econômicos que causa principalmente para produtores em que a criação de ovinos é principal fonte de renda. Entre inúmeros agentes, é a principal causadora da epididimite contagiosa ovina. Reduz os índices reprodutivos, aumenta anualmente o número de carneiros não aptos à atividade reprodutiva, gera diminuição da vida reprodutiva dos machos, abortamentos, mortalidade perinatal e a consequente diminuição nos rendimentos de carne e lã (ROBLES, 2008).

A bactéria se multiplica nos órgãos afetados e é eliminada à medida que as células infectadas são destruídas (MEGID et al., 2016). A eliminação de *B. ovis* ocorre principalmente por meio do sêmen do animal infectado, de forma intermitente e por períodos prolongados (WORTHINGTON et al., 1985; PAOLICCHI et al., 1991).

Ao final do segundo mês de infecção ocorre a bacteremia e o micro-organismo se localiza no trato genital, baço, rins, fígado, pulmão e outros gânglios linfáticos e multiplica-se nesses órgãos (GIL TURNES, 1998; MEGID et al., 2016).

A cauda do epidídimo é o local em que se observa maior alteração, geralmente unilateral, inicialmente com edema palpável, seguido de hiperplasia e fibrose, que passa a apresentar consistência firme à palpação. A inflamação do epidídimo causa degeneração seminal no testículo adjacente e alteração na concentração, motilidade e morfológia dos

espermatozóides, causando assim queda na fertilidade. O aumento da cauda desse órgão caracteriza cronicidade da doença (FOSTER et al., 1989; BLASCO, 1990; WEST et al., 1993; RIDLER; WEST, 2011; MEGID et al., 2016).

A infecção pode ocorrer em animais que ainda não tiveram contato sexual, principalmente em períodos de estabulação prolongada, quando estes animais têm contato com a urina de outros já infectados. Nessas condições, a bactéria penetra no organismo pela mucosa nasal, oral, conjuntival e pela via percutânea, quando há feridas ou escoriações (ALTON et al., 1988; BULGIN, 1990). Além disso a *B. ovis* não impede a concepção e eventualmente verificam-se infertilidade, morte embrionária e abortamentos ou, ainda nascimento de cordeiros fracos. As fêmeas que abortam têm infecção persistente e o agente é isolado da placenta, descargas vaginais e leite. Cordeiros nascidos de fêmeas infectadas raramente desenvolvem a infecção (MEGID et al., 2016).

Nas criações de ovinos em sistema extensivo, o contágio se dá em duas épocas. Primeiramente na fase de pré-serviço quando os machos começam a ter um aumento da libido e ter um comportamento homossexual de montar, cheirar e lamber outros machos e posteriormente com contágio indireto durante o serviço, quando uma fêmea saudável atua de forma passiva como agente intermediário entre dois machos infectados. Isto não quer dizer que a fêmea adoeça, pois para que ela desenvolva a enfermidade ela deverá estar prenhe (ROBLES, 2008).

A espécie ovina se infecta de forma natural pela *B. ovis*, embora já tenha havido confirmação da transmissão da bactéria de carneiros infectados para cervos criados no mesmo pasto, e entre cervos infectados (RIDLER; WEST, 2011). Os caprinos podem ser infectados de forma experimental, porém são menos suscetíveis quando comparados aos ovinos, e a infecção nessa espécie é de caráter leve e de curta duração (BURGESS et al., 1985).

Ao contrário do que ocorre na brucelose bovina, a manutenção da infecção por *B. ovis* em um rebanho ocorre principalmente por meio do macho infectado, e este também é o principal responsável pela transmissão da infecção entre os animais. Por esta razão, o diagnóstico da brucelose ovina causada por *B. ovis* deve ser realizado fundamentalmente nos machos da propriedade a ser investigada (ROBLES, 2008).

Para que haja o controle da brucelose ovina é necessário o estabelecimento de medidas que tenham como alicerce a identificação e eliminação de animais infectados, doentes ou portadores, e o bloqueio da introdução de novos animais infectados em um

rebanho. Desta forma, é fundamental a existência de métodos diagnósticos eficientes, rápidos e viáveis em sua execução (COSTA, 2010).

### 3.3 Diagnóstico

O diagnóstico da brucelose pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos (BRASIL, 2006).

Os métodos indiretos ou sorológicos utilizados no diagnóstico da brucelose são importantes recursos utilizados nas campanhas de controle e erradicação da doença em bovinos e bubalinos (OLIVEIRA, 2003). Os mesmos identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados, baseando-se em抗ígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (ALTON et al., 1988; RAJASHEKARA et al., 2005; MINHARRO, 2009).

O diagnóstico sorológico é a base do combate à brucelose em rebanhos, permitindo o monitoramento tanto de propriedades como de regiões inteiras, além de monitorar zonas onde a doença já foi erradicada. Os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com抗ígenos padronizados e específicos para cada prova (ALTON, 1988). Os principais testes para brucelose, são os que buscam detectar anticorpos no soro e leite como também em muco vaginal e sêmen (PAULIN, 2003; BRASIL 2006).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) preconiza o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT) e o Teste de Anel em Leite (TAL) como provas de triagem e como provas confirmatórias o Teste do Mercaptoetanol (2-ME) e o Teste de Polarização Fluorescente (BRASIL, 2016). Como os testes sorológicos não apresentam sensibilidade absoluta, há necessidade de associação entre várias técnicas em busca de melhores resultados na detecção de animais positivos, principalmente na fase inicial da infecção e em infecções crônicas. Essa estratégia tem como base a escolha de um teste de triagem de fácil execução, pouco honeroso e com boa sensibilidade, seguido de um teste confirmatório apenas nos soros positivos no teste anterior, mais elaborados, e com melhor especificidade (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003; BRASIL, 2006).

Como teste de triagem temos o de soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), que é preparado com o antígeno acidificado na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala. É uma prova qualitativa

rápida, prática e de boa sensibilidade. Foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG é menos ativa em pH7, mudando de comportamento com a acidificação do meio. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19 em bovinos, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados (OMS, 1986; WRIGHT; NIELSEN, 1990; BRASIL, 2006).

O teste do anel em leite (TAL) foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) o torna bastante sensível. A prova revela anticorpos preferencialmente da classe IgA, presentes no leite e aderidos às moléculas de gordura pela sua fração Fc. São empregados mais comumente抗ígenos corados com hematoxilina, que dá a cor azul característica à reação positiva. Se existirem anticorpos no leite, eles se combinam com a *B. abortus* do antígeno, formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel de cor azulada na camada de gordura do leite caracterizando reação positiva (OMS, 1986; BRASIL, 2006).

Dentre os testes sorológicos confirmatórios temos o do Mercaptoetanol (2-ME), o de Soroaglutinação em Tubos (SAT) e a Reação de Fixação de Complemento (RFC). O teste do Mercaptoetanol é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos (SAT) (BRASIL, 2006). Tem sua especificidade aumentada por inibição da atividade aglutinante da IgM mediante processo químico que consiste no tratamento do soro com a droga 2-mercaptopropano (TYMONEY et al., 1988). A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME. Desta forma, resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais ser considerados infectados (BRASIL, 2006).

Como teste confirmatório temos ainda o Teste de Soroaglutinação em Tubos (SAT) chamada de prova lenta (leitura dos resultados é feita em 48 horas). É a prova sorológica mais antiga e ainda hoje bastante empregada. É utilizada em associação como teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina (BRASIL, 2006). É executada num pH neutro, e demonstra uma boa sensibilidade analítica na detecção dos isótipos bovinos com uma exceção importante, a IgG1 (WRIGHT E NIELSEN, 1990).

A Reação de Fixação de Complemento (RFC) é considerada a melhor prova para a confirmação da brucelose pelo sorodiagnóstico, mostrando a melhor correlação com os

isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (NIELSEN, 1995). É o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais. Na brucelose bovina, apesar da FC detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento (BRASIL, 2006). Trata-se de uma prova mais laboriosa e mais cara que as de aglutinação, sendo recomendado seu uso como confirmatória para os soros positivos à triagem (CHAPPEL, 1989).

Os testes imunoenzimáticos que têm apresentado melhores resultados para brucelose são os ELISA indiretos e competitivos (COLLING, 1998). O teste ELISA Indireto (I ELISA) possui alta sensibilidade, entretanto, sua especificidade assemelha-se àquela do AAT. Emprega-se como antígeno o lipopolissacarídeo de *B. abortus* imobilizado em placas de 96 poços. Como conjugado, utiliza-se um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina conjugado com a peroxidase. Agentes quelantes (EDTA/EGTA) são utilizados para minimizar reações não específicas (BRASIL, 2006). No teste ELISA Competitivo (C Elisa) utiliza-se também como antígeno imobilizado na fase sólida o lipopolissacarídeo (LPS) de *B. abortus*. No momento da prova, o soro a se testar é misturado com um anticorpo monoclonal específico contra a cadeia “O” de *B. abortus*. Apresenta como vantagens altas especificidade e sensibilidade e apesar de seu alto custo, é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose (NIELSEN, 1995; BRASIL, 2006).

O Teste de Polarização de Fluorescência (FPA) se fundamenta na comparação de velocidades dos movimentos aleatórios das moléculas em solução. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela (BRASIL, 2006). Se o anticorpo estiver presente no soro, irá ligar-se ao antígeno, e a taxa rotacional desse antígeno conjugado será alterada, e esta mudança poderá ser determinada pelo analisador de polarização fluorescente, baseado nas diferenças rotacionais entre a LPS e o complexo antígeno-anticorpo. O FPA é uma prova de simples execução, onde apenas o antígeno, com um indicador, é adicionado nas amostras diluídas (SAMARTINO, 1999). Este teste foi validado para o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos, suínos, ovinos, caprinos, bisões e cervídeos, já que a reação cruzada com epítópos comuns à *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* encontrados na cadeia O, permite o uso de um só antígeno por serem estas espécies de brucelas lisas (NIELSEN, 2001).

Nos métodos diretos de diagnóstico temos o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação em

cadeia da polimerase (PCR). O isolamento e a identificação da *B. abortus* a partir de material de aborto ou de secreções apresentam resultados muito bons quando a colheita e transporte do material é bem feita (BRASIL, 2006).

A aplicação da análise de DNA tem se intensificado bastante nos últimos anos, e o desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) tem sido largamente empregado nas áreas biológicas, em especial na medicina veterinária, pois muitas doenças infecciosas dependem de um diagnóstico rápido e seguro (OLIVEIRA, 2003).

Outro método molecular é PCR em tempo real (qPCR), baseada na PCR tradicional, que, além de amplificar, simultaneamente, ela determina medidas quantitativas ao longo dos ciclos da PCR, tornando-se uma ferramenta mais rápida, específica e sensível, dando a capacidade de quantificar o DNA durante as reações (SCHMITTGEN, 2000).

## Referências

- ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; et al. **Techniques for the Brucellosis Laboratory.** Paris: INRA, 1988. 190 p.
- BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.85-101, 2010. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010085>
- BATISTA, H. M.F. **Ocorrência de ovinos soropositivos para *Brucella ovi*, nos rebanhos dos estados do Ceará e Piauí.** Mestrado em Zootecnia – Universidade Estadual do vale do Aracaú, Sobral. Dissertação de Mestrado, 2011. 103 p.
- BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis.** Boca Raton: CRC Press, 1990, p.351-378.
- BLOOD. D.C; HENDERSON. J.A; RADOSTITS. M. **Doenças causadas por bactérias III.** Clínica Veterinária. Guanabara Koogan, 1991. Rio de Janeiro. 3 edição. p.503-504.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), Manual Técnico**, 2006, 196 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Instrução Normativa nº 19, de 10 de outubro de 2016.

BULGIN, M.S. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative clinically normal breeding rams. **Journal of the American Veterinary Medical Association.**, v.196, n.2, p.313-315, 1990.

BURGUSS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v.62, n.8, p.262-264, 1985.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb14247.x>

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**, London, [online], v. 5, n. 13, mar. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435926/> acesso em; 10 Jan de 2016.

CARTER, G. R. & CHENGAPPA, M. M. **Brucella**. In: CARTER, G. R. & CHENGAPPA, M. M. Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 4.ed. Philadelphia: London, 1991. P.196-201.

CARVALHO, B, R. **Potencialidades dos mercados para os produtos derivados de caprinos e ovinos**. CAPRITEC Disponível em <<http://www.capritec.com.br/>> Acesso em: 18 Dez de 2014.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.

COLLING, A. Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Diagnosis and epidemiology of animal siseases in Latin America**. Vienna: IAEA, 1998. p.3-14.

COSTA, M. Brucelose bovina e equina. In: CORREA, F. R; SCHAILD, A. L; MENDEZ, M. D. C. **Doença de ruminantes e equinos**. 2.ed. São Paulo. Varela, 2001. v.1, p. 187-197.

COSTA, L. F. **Avaliação comparativa entre PCR gênero-específica, PCR espécie-específica no diagnóstico da infecção por *Brucella ovis*.** Dissertação de Mestrado, UNESP, Botucatu, 2010, 63p.

CRAWFORD, R.P.; HUBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K, Duncan JR (Ed.). **Animal Brucellosis.** Boca Raton: CRC Press, p.131-151. 1990.

CORBEL MJ, ELBERG SS, COSIVI O (Ed.). **Brucellosis in humans and animals.** Geneva: WHO Press, 2006, 89p.

CORREIA, F.W.S. **Perfil setorial da caprinocultura no Mundo, Brasil, Nordeste e Sergipe - Sebrae.** 2008. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 out de 2016.

DONEV, D.M. Brucellosis as priority public health challenge in South Eastern European countries. **Croatian Medical Journal**, v.51, n.4, p. 283-284, 2010. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.283>

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin**, v.62, n.8, p.743-775, 1992.

FAO. Global livestock production and health atlas. Rome (Italy): FAO; 2006. Electronic edition. Available at: <http://kids.fao.org/glipha/>. Acesso em 10 Maio de 2016.

FERREIRA, A.C.; CARDOSO, R.; TRAVASSOS DIAS, I.; MARIANO, I.; BELO, A.; ROLÃO PRETO, I.; MATEIGAS, A.; PINA FONSECA, A.; CORREA DE SA, M.I. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. **Veterinary Research**, v. 34, n. 3, p. 297-305, 2003. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003005>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Produção de leite caprinoRoma: FAO, 2011a. \_\_\_\_\_. Rebanho de caprinos. Roma: FAO, 2011.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D. Pathology of reproductive tracts of Merino rams in north western Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.66, n.8, p.262-264, 1989.

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**, Reading, [online], v.57, n.11, p.2688–2693, 2007. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/ 57/11/2688>. Acesso: 20 Jun de 2015.

GARIN-BASTUJI, B.; BLASCO, J.M.; GRAYON, M.; VERGER, J.M. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. **Veterinary Research**, v. 29, n.3-4, p. 255-274, 1998.

GIL TURNES, C. Brucelose ovina. In: CORREA, R.F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.C. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 1998, p.161-169.

GUIDO, M. C.; GRASSO, L. M. P. **Brucelose**, 2005. Disponível em: <[www.mcguido.vet.br/brucelose.htm](http://www.mcguido.vet.br/brucelose.htm)>. Acesso em: 20 de Jun de 2016.

GUIMARÃES FILHO, C.; ATAÍDE JUNIOR, J. R., 2009. **Manejo básico de ovinos e caprinos: guia do educador**. Brasília: SEBRAE, 146p.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J. J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p. 313–326, 2005. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005003>

GODFROID, J. **Brucellosis in wildlife**. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 2002, v.21, n.2, p.277-286.

<https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1333>

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1-4, p.281-297, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2010.v.38. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>> Acesso em 10 Fev de 2016.

IBGE 2016. Ministério do Planejamento, desenvolvimento e gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Nacional, 2016.

JARDIM, G. C.; PIRES, P. P.; MATHIAS, L. A.; RIBEIRO, C.; KUCHEMBUCK, M. R. G. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 177-182, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2006000300009>

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. 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**, Belo Horizonte, [online], v. 32, n.3, p. 202-212, 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20vr2%20pag202-212.pdf>. Acesso em 23 Jun de 2015.

LIMA, T. de L.; STURN, R. M.; TAVOLARO, P.; RIBEIRO, A. R. B.; SOUSA, A. F. **Estudo exploratório do mercado das potencialidades de consumo do leite de cabra e seus derivados entre paulistanos**. Informações Econômicas, SP, v. 45, n. 3, p.30, 2015.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, C.P. **Doenças Infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, 1294 p.

MEGID, J; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; MEIRELLES, C.E.; MORETTI, D.M. Infecção em cão por *Brucella abortus*: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000600036>

MINHARRO, S. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil** [online]. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/LGPD-7SUNFX>. Acesso em 15 Jan de 2016.

NETO, S. M. J.; JÚNIOR, H. V. E.; CAMPOS, T, R.; FRANÇA, C. M. F. **Estudo da Viabilidade Econômica da Produção de Carne Ovina na Região dos Inhamuns Cearense: um estudo de caso.** Embrapa Caprinos Sobral, CE, 35p. 2007.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.27, p.9-17, 1995.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.2, p.163-170, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00386-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00386-2)

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 100, n. 1-2, p. 25-30, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135510>. Acesso em: 25 Jan de 2016.

OLIVEIRA, J. P. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em bovinos e bubalinos abatidos para consumo.** 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará.

OIE.ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Caprine and Ovine Brucellosis (except *Brucella ovis*).** 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/fr/normes/mmanual>. Acesso em: 21 Jun de 2015.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Bovine brucellosis. Terrestrial Animal Health Code.** 2013. Chapter 11.3. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2009/en\\_chapitre\\_1.11.3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11.3.htm) Acesso em: 15 Jun 2105.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos em brucellosis. Série de informes técnicos 740, Ginebra: OMS, 1986, 149p.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIES. **Código zoosanitário internacional, Enfermidades dos bovinos da lista B, Recomendações aplicáveis à enfermidades específicas.** Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>> Acesso em: 8 Jun de 2016.

OSLEN, S.; TATUM, F. Bovine brucellosis. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**. v.26, p.15-27, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.006>

PACHECO, W. A. **Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo.** Dissertação. USP, 2007. Disponível em <[www.teses.usp.br/teses/disponiveis](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis)>. Acesso em: 10 Mai de 2016.

PAOLICCHI, F.A. Epididimitis ovina por *Brucella ovis*: lesiones genitales y respuesta immune antiespermática. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.82, n.2, p.86-88, 2001.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; AKRITIDIS, N. et al. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Disease**, v.6, n.2, p.91–9, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO J. S. **O Combate à Brucelose Bovina: situação brasileira.** Jaboticabal: Funep, 2003. 154p.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.2, p.239-249, 2003.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico.** São Paulo, [online], v. 75, n. 3, p. 389-401, 2008. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75\\_3/paulin.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_3/paulin.pdf). Acesso em; 23 Jun 2016.

POESTER, F.P., GONÇALVES, V.S., LAGE, A.P., Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1-4, p.55–62, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00245-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00245-6)

POESTER, F. P.; NIELSEN, K.; SAMARTINO, L.E.; YU, W.L. Diagnosis of Brucellosis. **The Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.46-60, 2010. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010046>

PROBERT, W.; SCHRADERR, K.; KHUONG, N.; BYSTROM, S.; GRAVES, M. Real-time Multiplex PCR Assay for detection of *Brucella* spp. *B. abortus* and *B. melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1290-1293, 2004. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004>

QUISPE, R.C.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. **Revista de Investigación Veterinaria de Perú**, v.13, n.1, p.61-66, 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders, 2007, p.963-994.

RAJASHEKARA G.; GLOVER D.A.; KREPPS, M.; SPLITTER, G.A. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. **Cellular microbiology**, Oxford, [online], v.10, n. 7, p.1459-1473, 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14625822.2005.00570.x/abstract>.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n.1, p.61-66, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.013>

ROBLES, C.A. **Brucellosis de los carneros por *Brucella ovis***. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27p.

RODOLAKIS, A. Zoonoses in goats: How to control them. **Small Ruminant Research**, v.121, n. 11, p.12–20, 2014. RODOLAKIS, A. Zoonoses in goats: How to control them. **Small Ruminant Research**, v.121, n. 11, p.12–20, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.01.007>

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.95-101, 1993. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(93\)90001-L](https://doi.org/10.1016/0147-9571(93)90001-L)

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n.1–2, p. 69–81, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9)

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G; TOMASO, H.; ALDAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 58, n.2, p. 375–382, 2008. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/58/2/375>.

SEBRAE/RN. **Diagnóstico da Cadeia Produtiva Agro-industrial da caprinovinocultura do Rio Grande do Norte**, v. 3, Natal, 2001. 146p.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n. 3-4, p.392-398, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021>

SILVA JÚNIOR, F.F. J. MEGID, J., NOZAKI, C.N., PINTO, J. P.A.N. Evaluation of the ring test in an epidemiological surveillance of bovine brucellosis in herds and dairies. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.295-300, 2007.  
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000200004>

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n.1–2, p. 69–81, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9)

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G; TOMASO, H.; ALDAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 58, n.2, p. 375–382, 2008. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/58/2/375>.

**SEBRAE/RN. Diagnóstico da Cadeia Produtiva Agro-industrial da caprinovinocultura do Rio Grande do Norte**, v. 3, Natal, 2001. 146p.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n. 3-4, p.392-398, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021>

SILVA JÚNIOR, F.F. J. MEGID, J., NOZAKI, C.N., PINTO, J. P.A.N. Evaluation of the ring test in an epidemiological surveillance of bovine brucellosis in herds and dairies. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.295-300, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000200004>

SILVA, H. W da.; GUIMARÃES, C. R. B.; OLIVEIRA, T. S. Aspectos da Exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.2, n.2., p.121-125, 2012.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F.; BRUCELLA. In: Gyles CL, Thoen CO. (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, p.236-247, 1993.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press, 1988. p.135-144.

VIANA, J. G. A. **Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil**. Revista Ovinos, Ano 4, n. 12, Porto Alegre, março de 2008.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; DEN HARTIGH, A. B.; TSOLIS, R. M.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of *Brucella* spp. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p.109- 118, 2010. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010109>

WEST, D. M.; STAFFORD, K. J.; ALLEY, M. R.; et al. Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. **New Zealand Veterinary Journal**, v.41, n.2, p.82-86, 1993. <https://doi.org/10.1080/00480169.1993.35740>

WHO. World Health Organization. The control of neglected zoonotic diseases: a route to poverty alleviation. In: Proceedings of a Joint WHO/DFID-AHP/FAO/OIE Meeting. Geneva (Switzerland):20 and 21 September, 2005.

WORTHINGTON, R.W.; STEVENSON, B.J.; DE LISLE, G.W. Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. **New Zealand Veterinary Journal**, v.33, n.6, p.84-86, 1985.  
<https://doi.org/10.1080/00480169.1985.35175>

WRIGHT, P. & NIELSEN, K.H. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. (Ed.). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.

**Capítulo 2 – Detecção de *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* em leite caprino pela  
PCR em tempo real**

## **Detecção de *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* em leite caprino pela PCR em tempo real**

### **Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in goat milk by real-time PCR**

**Resumo:** A brucelose é uma zoonose de distribuição universal, que causa problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos. Cada espécie ou biovar de *Brucella* tem seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (ratos do deserto). Devido a escassez de dados oficiais em relação a ocorrência da brucelose em caprinos, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de anticorpos contra amostras lisas de *Brucella*, assim como utilizar a PCR em tempo real, para verificar a ocorrência de DNA de *B. abortus* e *B. melitensis* em amostras de leite caprino. Foram analisadas 48 amostras de leite e sangue de fêmeas caprinas na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. Das amostras de sangue submetidas ao AAT, apenas um animal (2,1%) foi regente. Todas as amostras foram negativas para o TAL e para a PCR em tempo real. Mesmo havendo baixa frequência de animais regentes, o monitoramento dos rebanhos deve ser constante devido ao fator zoonótico da enfermidade e aos prejuízos na produção animal.

**Palavras-chave:** Brucelose, caprinocultura, aborto, *Brucella* spp.

**Abstract:** Brucellosis is a zoonosis of universal distribution, which causes major health problems and economic losses. Each species or biovar of *Brucella* has its preferred host: *Brucella abortus* (bovines and buffaloes), *B. melitensis* (goats and sheep), *B. ovis* (sheep), *B. canis* (dogs), *B. neotomae*. Due the lack of official data on the occurrence of brucellosis in goats, the objective of this study was to investigate the occurrence of antibodies against *Brucella* smooth samples, as well as to use real-time PCR to verify the occurrence of *B. abortus* and *B. melitensis* in goat milk samples. It was analyzed 48 samples of milk and blood

of goat females in the Alto Paranaíba region of Minas Gerais. From the blood samples submitted to AAT, only one animal (2,1%) was regents. All samples were negative for TAL and for real-time PCR. Even though there is a low occurrence of reagents animals, the monitoring of the herds should be constant due to the zoonotic factor of the disease and the losses in animal production.

**Key-words:** Brucellosis, goat breeding, abortion, *Brucella* spp.

## Introdução

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. É uma zoonose de distribuição universal, acarretando problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos (BRASIL, 2006).

Cada espécie ou biovar de *Brucella* tem seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (caprinos e ovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (cães), *B. neotomae* (ratos do deserto) (BANAI; CORBEL, 2010; BRASIL, 2006).

Em caprinos a brucelose é caracterizada por abortos no terço final da gestação, queda na fertilidade, ocorrência de natimortos e diminuição na produtividade leiteira (ALVES et al., 1997).

O animal infectado é para o homem e para outros animais a principal fonte de infecção que se dá por contato direto, de forma ocupacional ou ingestão de produtos contaminados, principalmente por eliminação nas secreções vaginais e por meio do leite (ELZER, 2002). As localizações de maior frequencia do agente no animal infectado são: linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino e úbere (BRASIL, 2006).

O principal agente etiológico da brucelose em caprinos e ovinos é a *Brucella melitensis*, também responsável por causar a brucelose humana, conhecida como febre de Malta (FAO, 2006). A brucelose em caprinos e ovinos é considerada uma doença de menor importância no Brasil, pois a *B. melitensis* ainda não foi diagnosticada no país (POESTER et

al., 2002; SELEEM et al., 2010).

A infecção por *Brucella melitensis* em caprinos é similar à infecção causada por *B. abortus* em bovinos (MEGID et al., 2016). Nos pequenos ruminantes, a infecção por *B. melitensis* causa doença apenas em animais sexualmente maduros e animais jovens podem ser infectados, porém, não mostram nenhum sinal clínico, e a resposta sorológica é fraca e transitória (ALTON, 1990).

Para o diagnóstico sorológico da *Brucela abortus* o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) preconiza o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT) e o Teste de Anel em Leite (TAL) como provas de triagem e como provas confirmatórias o Teste do Mercaptoetanol (2-ME) e a Reação de Fixação de Complemento (RFC) (BRASIL, 2006).

A aplicação da análise de DNA tem se intensificado bastante nos últimos anos, e o desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) tem sido largamente empregado nas áreas biológicas, em especial na medicina veterinária, pois muitas doenças infecciosas dependem de um diagnóstico rápido e seguro (OLIVEIRA, 2003).

Outro método molecular é a PCR em tempo real (qPCR), baseada na PCR tradicional, que, além de amplificar, simultaneamente, determina medidas quantitativas ao longo dos ciclos da PCR, tornando-se uma ferramenta mais rápida, específica e sensível, dando a capacidade de quantificar o DNA durante as reações (SCHMITTGEN, 2000).

Devido a escassez de dados oficiais em relação a ocorrência da brucelose em caprinos, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de anticorpos contra amostras lisas de *Brucella*, assim como utilizar a PCR em tempo real, para verificar a ocorrência de DNA de *B. abortus* e *B. melitensis* em amostras de leite individuais na Região do Alto Paranaíba, MG.

## **Material e métodos**

Foram coletadas 48 amostras de leite individuais de sangue de todas as fêmeas em lactação de duas propriedades produtoras de caprinos de leite na região do Alto Paranaíba, MG. Uma propriedade localizada no município de São Gotardo possuia sistema de produção intensivo, com os animais confinados em aprisco, com piso ripado suspenso. O manejo sanitário e nutricional era acompanhado por Médico Veterinário e Zootecnista. Na outra propriedade situada no município de Patos de Minas, o sistema de produção era semi-extensivo, com aprisco ripado suspenso, apenas para alojar os animais no período noturno. Não havia assistência médica veterinária e fornecimento de programa de nutrição adequada à espécie. Os animais conviviam e pastejavam juntamente com ovinos e bovinos e não recebiam as vacinas preconizadas para pequenos ruminantes.

Após a coleta, o material foi conduzido, em caixas isotérmicas, refrigerado, ao Laboratório de Doenças Infeciosas do Centro Universitário de Patos de Minas, MG.

Para o diagnóstico sorológico da brucelose, foram realizados os exames do teste do anel do leite (TAL) em amostras individuais, e do antígeno acidificado tamponado (AAT).

Para o teste do AAT, amostras de sangue venoso foram coletadas por venopunção com auxílio de sistema coletor a vácuo, sem anti-coagulante para obtenção de soro, sendo aliquotadas, identificadas e mantidas a -20°C até o momento das análises.

Amostras para o TAL foram colhidas após a anti-sepsia dos tetos e descarte dos três primeiros jatos de leite de cada metade mamária. Dez mL de amostras individuais de leite de cada teto foram colhidas, por ordenha manual, e acondicionadas em tubos falcon estéreis.

Os testes de TAL e AAT foram executados no Laboratório de Doenças Infeciosas do Centro Universitário de Patos de Minas segundo protocolo preconizado pelo manual técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2006).

A PCR em tempo real para o diagnóstico da *B. abortus* e *B. melitensis* foi executada

para todas as amostras de leite coletadas e congeladas, pelo laboratório TECSA® – Tecnologia em Saúde Animal, em Belo Horizonte, MG.

Para o protocolo de extração de DNA foi utilizado o mini kit QIAamp DNA seguindo as instruções do fabricante. No preparo da reação foi utilizado o Kit para SYBR qPCR: Fast SYBR® Green Master Mix (2X –10 uL/reAÇÃO) - Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems).

A Concentração dos primers foi de 300 nM cada (0,6 uL cada, na concentração 10 uM). O volume template (DNA da amostra): 5 uL; volume H<sub>2</sub>O nuclease free: 3,8 uL; volume total de reação: 20 uL.

O equipamento utilizado para o programa/ciclagem foi o Step One Real Time PCR System.

Os controles positivos foram quantificados no Qubit 2.0 (Thermo) e considerados no esquema de validação em 5 diluições 1:10 (todas resultantes em amplificação).

Os controles positivos para *B. abortus* e *B. melitensis* foram doadas pelo Laboratório de Brucelose do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Pedro Leopoldo, MG.

Para amplificação do fragmento de DNA (*B. abortus*) foram utilizados os primers, BRUAB2 0168-F e BRUAB2 0168-R descritos por Hinic et al., (2008), que amplificam um fragmento de 498 pb (Tab.1).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella abortus*.

Primers	Sequência	Amplicon
BRUAB2 0168-F	5' GCACACTCACCTCCACAACAA 3'	498 pb
BRUAB2 0168-R	5' CCCCGTTCTGCACCAGACT 3'	

Para amplificação do fragmento de DNA (*B. melitensis*) foram utilizados os primers

BMEII0499-Re BMEII0499-F por Hinic et al., (2008), que amplificam um fragmento de 252pb (Tab.2).

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella melitensis*.

Primers	Sequência	Amplicon
BMEII0499-R	5' CCAGCTTTGGCCTTTCC 3'	252pb
BMEII0499-F	5' TCGCATCGGCAGTTCAA 3'	

Para a análise de dados utilizou-se a estatística descritiva com o software Microsoft Excell 2010 (Microsoft Co., EUA), onde obteve-se o cálculo de frequência.

## Resultados e Discussão

Todas as 48 amostras testadas para o teste do anel do leite (TAL) não apresentaram reatividade e, portanto, foram consideradas negativas. Em pesquisa desenvolvida por Messias et al., (2011), amostras coletadas de 14 propriedades produtoras de leite de cabra no estado da Paraíba, as quais em conjunto somavam um rebanho de 254 cabras em lactação, foram negativas para o TAL. Porém sabe-se que a excreção de *Brucella* no leite é geralmente intermitente e normalmente somente aparece de 6 a 12 dias após o aborto (FERREIRA; FERREIRA, 1990; LOUZÁ, 1993).

Para o teste de AAT, das 48 amostras analisadas, apenas uma (2,03 %) foi reagente. Carneiro et al., (2005) relataram frequencia de 9,0% (36/400) de caprinos sororeagentes no Estado da Bahia. Em Pernambuco, Pinheiro Junior et al., (2008), avaliaram 340 amostras de soro de caprinos e apenas (0,6%) foram reagentes e 338 (99,4%) não reagentes ao AAT. O mesmo foi registrado por Fraguas et al., (2004) no Rio de Janeiro, que ao analisarem 953 amostras de soros caprinos encontraram 0,2% de animais reagentes.

Varges et al., (2014) em pesquisa desenvolvida no Rio de Janeiro registraram sete (5,6%) dos 124 caprinos testados, sororreativos ao AAT, sendo todos confirmados pelo 2-ME. Das três vacas presentes na propriedade, uma apresentou sororreatividade aos dois métodos diagnósticos empregados. Considerou-se que este animal, que fornecia leite para os cabritos, teria sido a mais provável fonte de infecção para os cabritos do rebanho. O mesmo não ocorreu nesta pesquisa, onde as quatro vacas que fornecem leite aos cabritos, testadas para o TAL e ATT foram negativas. Deve-se, porém, salientar que duas vacas que também forneciam leite aos cabritos foram descartadas antes da execução desta pesquisa.

Embora o principal agente da brucelose em caprinos seja a *B. melitensis*, não há relatos da mesma no Brasil (POESTER et al., 2002), mas existem relatos de infecções esporádicas causadas por *B. abortus* em cabras (MEGID et al., 2007).

É importante ressaltar que por meio de testes sorológicos, não é possível distinguir entre a presença de aglutininas anti-*B. abortus* e *B. melitensis* (VARGES et al., 2014). No entanto, a partir dos aspectos epidemiológicos e a ausência de *B. melitensis* no Brasil, os achados deste estudo sugerem fortemente tratar-se de infecção por *B. abortus*, concluindo-se, portanto, que a brucelose por *B. abortus* ocorre em caprinos e que esta importante enfermidade requer maior atenção dos veterinários e um programa de diagnóstico e controle se faz necessário.

As 48 amostras de leite testadas na qPCR não apresentaram DNA de *B. abortus* e *B. melitensis* e, portanto, foram consideradas negativas. A amostra de soro reagente no AAT não foi reagente à qPCR. Wareth et al., (2015) em pesquisa realizada com amostras de soro de dez vacas, cinco búfalas, uma ovelha e nove cabras, coletadas logo após o aborto, relataram que todas foram positivas para o gênero específico bcsp31 para os ensaios com PCR em tempo real. O DNA de *B. abortus*, foi identificado em todas as amostras de soro coletadas das vacas, búfalas, cabras e ovelha, sendo que a ovelha foi positiva para *B. abortus* e *B. melitensis*.

A ocorrência de uma cabra reagente ao AAT gera preocupação, pois pode ser que a mesma teve uma infecção subclínica e não apresentava bacteremia na época da coleta, e por essa razão não foi detectada a presença de DNA de *Brucella abortus* e *B. melitensis*. Sabe-se da limitação dos testes de diagnósticos, desta forma, investigações constantes devem ser feitas.

Sabe-se que o aquecimento do leite a 80-85 °C por 10 minutos elimina a bactéria e que a mesma não sobrevive se o queijo é curado por um período maior que três meses (OLSEN; TATUM, 2010; LUCE et al., 2012). Desta forma, a legislação européia requer que todos os queijos feitos com leite cru, sejam submetidos a cura por um período não menor que 60 dias (REGULATION (EC), 2004). Fato que não ocorre no Brasil, tornando o risco de contaminação pelo leite e seus derivados maior.

Na propriedade onde ocorreu a positividade de uma cabra reagente para o AAT, a ordenha era realizada manualmente e o leite comercializado *in natura*, ou congelado, o que leva a preocupação da possibilidade de contaminação tanto do ordenhador quanto do consumidor de leite. Ressaltando ainda que as crianças, por problemas de intolerância ao leite bovino, e idosos, são os que mais consomem o leite caprino. Salienta-se que em cabras, a excreção da *Brucella* é mais prolongada e abundante, desta forma há um risco aumentado de infecção através do consumo de leite desta espécie (FERREIRA; FERREIRA, 1990; LOUZÃ, 1993).

## Conclusão

Foi constatada a presença de um caprino sorologicamente reagente para *Brucella abortus* em uma propriedade de caprinos leiteiros na região do Alto Paranaíba, MG. Entretanto não foram detectados DNA de *B. abortus* e *B. melitensis* nas amostras de leite.

A investigação da ocorrência de brucelose em caprinos deve ser constante, para que medidas de controle adequadas sejam tomadas, além de estudos complementares para a

elucidação da epidemiologia da brucelose nesses animais e conscientização dos criadores, por meio de programas de educação sanitária para prevenir e erradicar a doença de suas propriedades.

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob ANÁLISE FINAL Nº 064/17 do protocolo de registro CEUA/UFU 016/17.

### Referências

ALTON, G.G. **Brucella melitensis**. 1990.In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds), Animal Brucellosis. CRC Press Inc., Boca Raton, p. 383-409

ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; LEITE, E.A.; GOMES, A. A. B. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-Brucella em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, p. 89–91, 1997.

BANAI, M.; CORBEL, M. Taxonomy of *Brucella*. **Open Veterinary Science Journal**, v.4, p.85-101, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**: Manual técnico. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006, 181 p.

BRICKER, B.J., 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.435–446, 2002.

CARNEIRO, J.; ZACHARIAS, F.; PACHECO, S.T.; MENDONÇA LIMA, F.W. Investigação da soropositividade para brucelose em rebanhos caprinos produtores de leite para consumo humano. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 6, n. 2, p. 53-58, 2005.

ELZER, P.H; HAGIUS, S.D; DAVIS, D.S; DELVECCHIO, V.G; ENRIGHT, F.M. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis., **Veterinary Microbiology**, v. 90, n.1-4, p. 425-31, 2002.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00226-2.

FAO. **Global livestock production and health** atlas. Rome (Italy): FAO; 2006.Electronic edition. Available at: <http://kids.fao.org/glipha/>. Acesso em: 15 maio, 2016.

FERREIRA, A.; FERREIRA, C.; **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1990. p. 125-142.

FRAGUAS, S de A.; RISTOW, P.; CARDOSO, V.S.; SOUZA, G.N.; LILENBAUM, W. Ocorrência de brucelose caprina em propriedades de exploração leiteira do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 26, n.1, p. 21-25, 2004.

HINIC, V.; BODARD.: THOMANN, Z.; CVETNIC.; MAKAYA, P.V.; FREY, J.; ABRIL, C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-timePCR systems. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, p.375-378, 2008.doi: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.

LUCE, R.; SNOW, J.; GROSS, D.; MURPHY, T.; GRANDPRE, J.; DALEY, W. R.; BRUDVIG, J. M.; ARI, M.; HARRIS, L.; CLARCK, T. A. Brucellosis seroprevalence among workers in at-risk professions: Northwestern Wyoming, 2005 to 2006. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v.54, p. 1557-1560, 2012.doi: 10.1097/JOM.0b013e31826e27ce.

LOUZÃ, AC. **Brucelose - Modelo de zoonose de impacto sócio-económico**. Parte I. Veterinária Técnica., v.43, p.21-28, 1993.

MEGID, J.; SALGADO, V.R.; KEID, L.B.; SIQUEIRA, A.K.; MEIRELLES, C.E.; MORETTI, D.M. Infecção em cão por Brucella abortus: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1583-1585, 2007.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, C.P. **Doenças Infecciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, 1294 p.

MESSIAS, S. N.; NAGNALDO, T.; LUCENA, F. C. N. **Agropecuária Técnica**, v. 32, n. 1, 2011.

OLIVEIRA, J. P. **Estudo das lesões sugestivas de brucelose em bovinos e bubalinos abatidos para consumo**. 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará.

OLSEN, S.; TATUM, F. Bovine brucellosis. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**. v.26, p.15-27, 2010.Doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.006.

PINHEIRO JUNIOR, J. W. P.; SOUZA, M. M. A.; NEURISVAN, R. G.; SANTANA, V. L. A.; MOTA, R. A. Frequência de aglutininas anti-Brucella abortus em caprinos e ovinos no sertão do estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1096-1101, 2008.

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

REGULATION (EC). Nº 853/2004 of the European Parliament and the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union. L 39, 2004.

RUSSEL, A. D.; YARNYCH, V. S.; KOULIKOVSKII, A. V. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and of zoonotic diseases. Geneva: World Health Organization, 1984. (Who/Vph/84.4) Samartino LE, Enright FM. Patogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology Microbiology and Infection Diseases**, v.16, p.95-101, 1993.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46(1–2) p. 69–81, 2000.

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

VARGES, R.; MEDEIROS, L.; LILEBAUM.W. Sororreatividade para *Brucella abortus* em rebanho caprino no estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato de caso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.**, v. 15, n. 2, p. 103-104, 2008.

WARETH, G.; MELZER, F.; TOMASO, H.; ROESLER, U.; NEUBAUER, H. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR. **BMC Research Notes**, v.8, p. 212, 2015.

**Capítulo 3 - Investigação de *Brucella ovis* por PCR em tempo real em sêmen ovino  
comercial**

## **Investigação de *Brucella ovis* por PCR em tempo real em sêmen ovino comercial**

### **Investigation of *Brucella ovis* by real-time PCR in commercial sheep semen**

Nadia Grandi Bombonato<sup>1</sup>; Mariana Assunção de Souza<sup>1</sup>; Anna Monteiro Correia Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil. Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central. Correspondence: N. Bombonato [nadia@unipam.edu.br–Tel.: +55 (34) 99103-7731]. Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, RuaCeará, s/n,2D-33, Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

**Resumo:** A brucelose ovina é uma doença infecto-contagiosa de distribuição mundial causada pela *Brucella ovis* e apesar de ser um agente não zoonótico, provoca doença crônica em ovinos, conhecida como Epididimite Contagiosa dos Carneiros ou Epididimite Ovina. Provoca lesões genitais, caracterizadas por epididimite e sêmen com qualidade variável gerando diminuição da vida reprodutiva dos machos, abortamentos e mortalidade perinatal. O objetivo da pesquisa foi verificar por meio da PCR em tempo real, a presença da *B. ovis* em semen comercial de ovinos com aptidão de corte das raças Santa Inês e Dorper. Todas as 20 amostras de sêmen analisadas pela PCR em tempo real nesta pesquisa não apresentaram DNA de *Brucella ovis* e, portanto, foram negativas, confirmando que o manejo sanitário dos carneiros doadores de sêmen das centrais de produção e distribuição em questão era eficiente.

**Palavras chave:** Brucelose ovina, inseminação, doenças reprodutivas, *Ovis aries*.

**Abstract:** Sheep brucellosis is an infectious disease of worldwide distribution caused by *Brucella ovis* and despite being a non-zoonotic agent, causes chronic disease in sheep, known as Sheep Contagious Epididymitis or Ovine Epididymitis. Causes genital lesions, characterized by epididymitis and semen with variable quality, resulting in decreased reproductive life of males, abortions and perinatal mortality. The objective of this study was to verify the presence of *B. ovis* in commercial semen of sheep with breeding ability of the Santa Inês and Dorper breeds. All 20 semen samples analyzed by real-time PCR in this study did not present *Brucella ovis* DNA and therefore were negative, confirming that the sanitary management of semen donor sheep from the production and distribution centers in question was efficient.

**Key-words:** Sheep brucellosis, insemination, reproductive diseases, *Ovis aries*.

## Introdução

A Brucelose ovina é um agente não zoonótico, intracelular facultativo que coloniza células do sistema macrocítico linfocitário, que provocando doença crônica em ovinos, conhecida como Epididimite Contagiosa dos Carneiros ou Epididimite Ovina (BURGUESS, 1982; QUISPE et al., 2002). Apesar de ser considerada de menor relevância quando comparada às outras bactérias do mesmo gênero, devido ao fato de não ser zoonótica, a *B. ovis* tem sua importância relacionada aos prejuízos econômicos que causa principalmente para produtores em que a criação de ovinos é principal fonte de renda (ROBLES, 2008).

É caracterizada por induzir lesões genitais, caracterizadas por epididimite e sêmen com qualidade variável (MEGID; MATHIAS; ROBLES, 2010) reduzindo desta forma os índices reprodutivos com o aumento anual do número de carneiros não aptos à atividade

reprodutiva, gerando diminuição da vida reprodutiva dos machos, abortamentos, mortalidade perinatal e a consequente diminuição nos rendimentos de carne e lã (ROBLES, 2008).

A bactéria se multiplica nos órgãos afetados e é eliminada à medida que as células infectadas são destruídas (MEGID et al., 2016). As alterações testiculares características da epididimite em ovinos são geralmente unilaterais, evoluindo para atrofia testicular na fase crônica e baixa fertilidade. A transmissão se dá pela ingestão e/ou contato sexual com descargas genitais (ALVES et al., 2006) tendo o sêmen como a principal via de excreção da *B. ovis* (PAOLICCHI et al., 1993).

A Instrução Normativa n. 87 da Secretaria de Defesa Agropecuária, de 10 de dezembro de 2004, aprovou o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO), com o controle e erradicação das doenças de caprinos e ovinos, por meio de ações sanitárias e de vigilância epidemiológica. Dentre as estratégias de atuação do PNSCO estão o cadastro de estabelecimentos, controle de trânsito de animais, certificação de estabelecimentos, cadastramento de médicos veterinários do setor privado e credenciamento de laboratórios para realização de exames diagnósticos das doenças de controle oficial, entre elas a brucelose ovina causada pela *B. ovis* (PNSCO, 2005).

O diagnóstico da brucelose ovina é realizado geralmente por meio de provas sorológicas sendo as mais utilizadas a Fixação de Complemento (FC), Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (ROBLES, 1998).

As falhas diagnósticas dos testes diagnósticos convencionais levaram pesquisadores a desenvolver métodos moleculares de PCR baseados na amplificação de fragmentos de DNA de *B. ovis* em amostras de sêmen de animais infectados (MANTEROLA et al., 2003; SAUDERS et al., 2007). PCR em Tempo Real também conhecido como PCR quantitativo também é outra ferramenta que permite a quantificação do DNA alvo. Devido a um menor tempo de extensão por não precisar de eletroforese, a PCR em tempo real é ainda menos demorada (HINIC et al., 2008).

Devido aos sérios problemas reprodutivos que a *Brucella ovis* causa em rebanhos ovinos, o objetivo da pesquisa foi investigar por meio da PCR em tempo real, a presença desta bactéria em semen comercial dos ovinos com aptidão de corte das raças Santa Inês e Dorper mais requisitados pelos criadores no sudeste do Brasil.

### **Material e métodos**

A pesquisa foi conduzida utilizando-se 20 amostras de semen ovino commercial das raças ovinas de corte, Santa Inês e Dorper, oriundas de duas centrais distribuidoras de sêmen ovino na região sudeste do Brasil.

As amostras de sêmen congeladas foram enviadas ao laboratório TECSA<sup>®</sup> em Belo Horizonte e foram submetidas ao diagnóstico por PCR em Tempo Real para *Brucella ovis*.

Para o protocolo de extração de DNA foi utilizado o mini kit QIAamp DNA seguindo as instruções do fabricante. No preparo da reação foi utilizado o Kit para SYBR qPCR: Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (2X –10 uL/reAÇÃO) - Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems).

A Concentração dos primers foi de 300 nM cada (0,6 uL cada, na concentração 10 uM). O volume template (DNA da amostra): 5 uL; volume H<sub>2</sub>O nuclease free: 3,8 uL; volume total de reação: 20 uL.

O equipamento utilizado para o programa/ciclagem foi o Step One Real Time PCR System.

O controle positivo para *B. ovis* foi doado pelo Laboratório de Brucelose do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Pedro Leopoldo, MG. O mesmo foi quantificado no Qubit 2.0 (Thermo) e considerado no esquema de validação em 5 diluições 1:10 (todas resultantes em amplificação).

Para a amplificação fragmento de DNA (*B. ovis*) para a técnica da PCR gênero-específica, os *primers* utilizados foram BOV A0504-R e BOV A0504-F designados para a sequência de nucleotídeos da *Brucella ovis* (Tab.2) (HINIC et al., 2008).

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na PCR para identificação de *Brucella ovis*.

Primers	Sequência	Amplicon
BOV A0504-R	5' CCCTGATTCAAGCCATTCC 3'	
BOV A0504-F	5'CGCTATCGATGGCGTAGTTG 3'	499 pb

## Resultados e Discussão

Segundo Schmittgen e Zakrajsek (2000) a PCR em tempo real (qPCR) é baseada na PCR tradicional, porém, além de amplificar, simultaneamente, ela determina medidas quantitativas ao longo dos ciclos da PCR, tornando-se assim uma ferramenta mais rápida, específica e sensível, dando a capacidade de quantificar o DNA durante as reações. Desta forma vários autores avaliaram o PCR em tempo real para detecção de *Brucella* spp., (HINIC, 2008). Porém Moustaca et al., (2015) relataram pela primeira vez a PCR em tempo real específica para *B. ovis*, enfatizando que o diagnóstico espécie-específico para esta bactéria em carneiros é extremamente importante para diferenciá-la de outras espécies de alto potencial zoonótico que podem também infectar ovinos.

Todas as 20 amostras de sêmen analisadas pela PCR em tempo real nesta pesquisa foram negativas para *Brucella ovis*. Isso pode confirmar que o manejo sanitário e monitoramento constante dos carneiros doadores de sêmen das centrais de produção e distribuição, e preconizado pelos órgãos oficiais foi eficiente.

Moustaca et al., (2015) em pesquisa desenvolvida com ovinos concluíram que ensaios com PCR em tempo real para detectar *Brucella ovis* em sêmen tiveram alta sensibilidade e

especificidade e que esses ensaios têm potencial para ser usado como ferramentas adicionais para um diagnóstico mais rápido de epididimite infecciosa ovina associada com *B. ovis* ou *Histophilus somni* utilizando-se amostras de sêmen e urina.

De acordo com o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO), a brucelose causada pela *B. ovis* é uma das enfermidades de notificação oficial, sendo os animais positivos direcionados ao abate sanitário. Segundo a Instrução Normativa nº 1, de 22 de janeiro de 2014, que determina os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen, os ovinos para ingressarem no Centro de Coleta e Comercialização de Semen (CCPS) deverão estar acompanhados de documento de trânsito animal e apresentar testes negativos de AAT ou 2-Mercaptoetanol (2-ME) ou teste de Fixação de Complemento, realizados dentro dos últimos 60 dias para brucelose. Além disso, esses exames devem ser repetidos constantemente durante a permanência dos animais na CCPS e antibióticos são adicionados durante o processamento do sêmen (BRASIL, 2004).

## **Conclusão**

As amostras analisadas de sêmen congelado das Centrais de Produção e Comercialização de Sêmen foram negativas para a PCR em tempo real, de acordo com o preconizado pela legislação.

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob ANÁLISE FINAL Nº 064/17 do protocolo de registro CEUA/UFU 016/17.

## **Referências**

ALVES, F. S. F.; CHAPAVAL, L., PINHEIRO, R. R. *Enfermidades e microrganismos passíveis de transmissão pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos*. Sobral:

Embrapa Caprinos, 2006. 29 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 87, de 10 de dezembro de 2004. *Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos* (PNSCO) Brasília: MAPA, 2004, 5p.

BURGUESS, G.W.; SPENCER, T.L.; NORRIS, M.J. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*, v.62, n.8, p.262-264, 1985.

HINIĆ, V.; BODDARD, I.; THOMANN, A. et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiological Methods*, v.75, n.2, p.375-378, 2008.

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCÉS, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J.M.; MARÍN, C.M.; LÓPEZ, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Veterinary Microbiology*, v.92, n.1-2, p.65-72, 2003.

MEGID, J.; MATHIAS, L. A.; ROBLES, C. A. Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *The Open Veterinary Science Journal*, v. 4, p. 119- 126, 2010.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, C.P. *Doenças Infeciosas em animais de produção e companhia*. Rio de Janeiro: Roca, 2016, 1294 p.

MOUSTACA, V. S.; SILVA, T. M. A.; COSTA, L. F.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Real-time PCR for detection of *Brucella ovis* and *Histophilus somni* in ovine urine and semen. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.67, n.6, p.1751-1755, 2015.

PAOLICCHI, F.A.; TERZOLO, H.R.; CAMPEIRO, C.M. Isolation *Brucella suis* from the sêmen of a ram. *Veterinary Record*, v.132, n.3, p.67, 1993.

QUISPE, R.C.; RIVERA, H.G.; ROSADIO, R.A. Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, v.13, n.1, p.61-66, 2002.

ROBLES, C. A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, v.79, n.1, p. 1-13, 1998.

ROBLES, C.A. *Brucellosis de los carneros por Brucella ovis*. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27p.

SAUNDERS, V. F.; REDDACLIFF, L. A.; BERG, T.; HORNITZKY, M. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. *Australian Veterinary Journal*, v.85, p.72-77, 2007.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 46, n.1–2, p. 69–81, 2000.

**Capítulo 4 - Investigação da ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em rebanhos  
ovinos**

## **Investigação da ocorrência de infecção por *Brucella ovis* em rebanhos ovinos**

### **Investigation of the occurrence of *Brucella ovis* infection in sheep flocks**

Nadia Grandi Bombonato<sup>1</sup>, Mariana Assunção de Souza<sup>1</sup> e Anna Monteiro Correia

Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central. Correspondence: N. Bombonato [nadia@unipam.edu.br– Tel.: +55 (34) 99103-7731]. Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas, Faculdade de Medicina Veterinária, Rua Ceará, s/n, 2D-33, Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

**Resumo:** A brucelose ovina é uma doença bacteriana infecciosa crônica causada por *Brucella ovis* e caracterizada por distúrbios reprodutivos, tais como diferentes graus de epididimite e orquite, placentite, aborto e elevada mortalidade de cordeiros. Apesar de considerada de menor relevância quando comparada às outras bactérias do mesmo gênero, devido ao fato de não ser zoonótica, a *B. ovis* tem sua importância relacionada aos prejuízos econômicos na criação de ovinos. O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência da *B. ovis* em rebanhos ovinos, na região do Alto Paranaíba, MG, por meio do teste sorológico de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e da PCR em tempo real. Das 30 amostras de soro ovino submetidas ao teste de IDGA para detecção de anticorpos contra *B. ovis*, 3 (10%) de uma mesma propriedade apresentaram reação positiva ao teste e confirmadas pela PCR em tempo real. Os resultados relatados por vários autores mostram que no Brasil a

brucelose em ovinos causada pela *B. ovis* encontra-se bastante disseminada. Desta forma conclui-se que o monitoramento das propriedades deve ser constante e que os animais a serem introduzidos no rebanho devem ser testados para *B. ovis*.

Termos para indexação: Epididimite, brucelose ovina, *Ovis aries*.

**Abstract:** Sheep brucellosis is a chronic infectious bacterial disease caused by *Brucella ovis* and characterized by reproductive disorders such as different degrees of epididymitis and orchitis, placentite, abortion and high mortality of lambs. Although considered of minor relevance when compared to other bacterias of the same genus, due to the fact that it is not zoonotic, *B. ovis* has its importance related to economic losses in sheep farming. The objective of this work was to verify the occurrence of *B. ovis* in sheep flocks in the region of Alto Paranaíba, MG, through the serological test of Immunodiffusion in Agar Gel (IDGA) and real time PCR. From 30 samples of sheep serum submitted to the IDGA test to detect antibodies against *B. ovis*, 3 (10%) of the same property showed a positive reaction to the test and confirmed by real-time PCR. The results reported by several authors show that in Brazil the brucellosis in sheep caused by *B. ovis* is disseminated. In this way, it is concluded that the monitoring of the properties must be constant and that the animals to be introduced in the herd should be tested for *B. ovis*.

Index terms: Epididymite, ovine brucellosis, *Ovis aries*.

## Introdução

A brucelose ovina é reconhecida como a mais importante causa de epididimite ovina, sendo uma das principais causadoras de infertilidade nesta espécie (RIDLER; WEST, 2011). É uma doença bacteriana infecciosa crônica causada por *Brucella*

*ovis* e caracterizada por distúrbios reprodutivos, tais como diferentes graus de epididimite e orquite, placentite, aborto e elevada mortalidade de cordeiros (NIILO et al., 1983; BAIGÚN et., 2000).

A *B. ovis* tem sua importância relacionada aos prejuízos econômicos que causa principalmente para produtores em que a criação de ovinos é principal fonte de renda. Entre inúmeros agentes, é a principal causadora da epididimite contagiosa ovina. Reduz os índices reprodutivos, aumenta anualmente o número de carneiros não aptos à atividade reprodutiva, gera diminuição da vida reprodutiva dos machos, abortamentos, mortalidade perinatal e a consequente diminuição nos rendimentos de carne e lã (ROBLES, 2008).

Os sinais clínicos iniciais causados pela brucelose ovina passam geralmente despercebidos, os animais apresentam um período de febre acompanhada de apatia, dispneia e inflamação do escroto (ROBLES, 2008).

Carneiros infetados com *B. ovis* frequentemente apresentam sêmen de baixa qualidade, grande quantidade de células inflamatórias, particularmente neutrófilos (ROBLES et al., 1998). A inflamação do epidídimo causa degeneração seminal no testículo adjacente e alteração na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides, causando assim queda na fertilidade. O aumento da cauda desse órgão caracteriza cronicidade da doença (FOSTER et al., 1989; BLASCO, 1990; WEST et al., 1993; RIDLER; WEST, 2011; MEGID et al., 2016).

A *B. ovis* não impede a concepção e eventualmente verificam-se infertilidade, morte embrionária e abortamentos ou, ainda nascimento de cordeiros fracos e pouco viáveis. As fêmeas que abortam têm infecção persistente e o agente é isolado da placenta, descargas vaginais e leite. Cordeiros nascidos de fêmeas infectadas raramente desenvolvem a infecção (MEGID et al., 2016).

O diagnóstico de epididimite em carneiros por *B. ovis* pode ser obtido por meio da

palpação do epidídimo, avaliação do sêmen, teste de aglutinação e hemoaglutinação, imunodifusão em gel de ágar (IDGA), reação de fixação do complemento (RFC), ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), teste com anticorpos fluorescentes, teste alérgico e isolamento no sêmen (AFZAL; KIMBERLING, 1980).

Mesmo havendo a possibilidade de uso vários testes de diagnósticos, ressalta-se a necessidade do diagnóstico diferencial entre a epididimitite dos carneiros causada por *B. ovis* e outras causadas por *Actinobacillus seminis* e *Haemophilus somnus* (CARVALHO JUNIOR et al., 2010).

Além dos métodos sorológicos como o IDGA e FC, outro método molecular utilizado no diagnóstico de doenças infecciosas é a PCR em tempo real (qPCR), baseada na PCR tradicional, que, além de amplificar, simultaneamente, determina medidas quantitativas ao longo dos ciclos da PCR, tornando-se uma ferramenta mais rápida, específica e sensível, dando a capacidade de quantificar o DNA durante as reações (SCHMITTGEN, 2000).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência da infecção por *B. ovis* em rebanhos ovinos, por meio do teste sorológico de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e da PCR em tempo real.

## **Material e métodos**

Foram examinadas 30 amostras de soro de ovinos em idade reprodutiva de 1 a 4 anos, das raças Santa Inês e mestiços Dorper, provenientes de três propriedades pertencentes a dois municípios da região do Alto Paranaíba, MG. Os municípios contemplados foram escolhidos em função do conhecimento prévio de proprietários que concordaram com a realização da investigação. De cada propriedade foram coletadas 10 amostras de sangue, sendo que cada propriedade possuia apenas um macho reprodutor.

O sistema de produção das três propriedades era do tipo semi-extensivo, com aprisco para abrigo dos animais durante a noite, produzem ovinos de corte e possuem assistência veterinária.

Por ocasião das colheitas, foi realizada uma avaliação clínica nos animais para a detecção de alterações sugestivas de infecção por *B. ovis*. A colheita de sangue foi realizada por meio de punção veno-jugular, e foi obtido um volume total de 10mL por animal. Após a retração do coágulo, o soro sanguíneo foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e armazenado a -20°C até a realização das provas sorológicas. As amostras de soro foram colocadas em tubos estéreis e identificados com o número do animal e o nome da propriedade e, em seguida, acondicionados em caixas isotérmicas com gelo, e enviados ao Laboratório TECSA<sup>®</sup>de Belo Horizonte.

Para a pesquisa de anticorpos contra *B. ovis*, foi utilizada a técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) empregando-se *kits* comerciais produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). A técnica foi executada de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *B. ovis*.

Para o protocolo de extração de DNA foi utilizado o mini kit QIAamp DNA seguindo as instruções do fabricante. No preparo da reação foi utilizado o Kit para SYBR qPCR: Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (2X –10 uL/reAÇÃO) - Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems).

A concentração dos primers foi de 300 nM cada (0,6 uL cada, na concentração 10 uM). O volume template (DNA da amostra) foi: 5 uL; volume H<sub>2</sub>O nuclease free: 3,8 uL; volume total de reação: 20 uL.

O equipamento utilizado para o programa/ciclagem foi o Step One Real Time PCR System.

O controle positivo foi quantificado no Qubit 2.0 (Thermo) e considerado no esquema de validação em 5 diluições 1:10 (todas resultantes em amplificação).

O controle positivo para *B. ovis* foi doado pelo Laboratório de Brucelose do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Pedro Leopoldo, MG.

Na amplificação do fragmento de DNA (*B. ovis*) para a técnica da PCR gênero-específica, os primers utilizados foram BOV A0504-R e BOV A0504-F designados para a sequência de nucleotídeos da *Brucella ovis* (Tab.1) (HINIC et al., 2008).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na qPCR para identificação de *Brucella ovis*.

Primers	Sequência	Amplicon
BOV A0504-R	5' CCCTGATTCAAGCCATTCC 3'	500 pb
BOV A0504-F	5'CGCTATCGATGGCGTAGTTG 3'	

Para a análise dos dados foi realizado o cálculo de frequência utilizando o software Microsoft Excel 2010. Para comparação de frequências foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível de significância fixado em  $p<0,05$  (bicaudal) para o intervalo de confiança de 95%, pelo software Graph Pad Prism, versão 7.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA).

## Resultados e discussão

Das 30 amostras de soro ovino submetidas ao teste de IDGA para detecção de anticorpos contra *B. ovis*, 3 (10%) apresentaram reação positiva ao teste. Silva et al., (2003) e Azevedo et al., (2004) no Rio Grande do Norte encontraram 34% em 290

amostras e 11,3% em 115 amostras respectivamente. Em pesquisa realizada em São Paulo, Nozaki et al., (2004) detectaram 12,0% em 1033 amostras. Já Clementino et al., (2007) na Paraíba verificaram um percentual menor de animais positivos, 5,57% em 498 amostras.

Mendonça et al., (2017) no estado de Sergipe, analisaram 932 soros ovinos pelo teste de IDGA, onde 41 (4,40 %) foram positivos, e entre os municípios analisados 73,68% (14/19) possuíam animais sororreagentes e 46,30% (25/54) das propriedades apresentaram pelo menos um animal positivo para *B. ovis* no IDGA. Verificou-se alta positividade de rebanhos com baixa soropositividade de animais e esse resultado, do ponto de vista epidemiológico, sugere que a infecção seja endêmica, pois regiões onde a enfermidade é recente há altas prevalências, de 20% a 60%, enquanto regiões endêmicas tendem a apresentar prevalências menores.

Salaberry et al., (2011), analizaram 334 amostras de soro sanguíneo de ovinos provenientes de 12 propriedades localizadas no município de Uberlândia, MG, por meio do teste de FC para o diagnóstico da *B. ovis*, e não observaram animais reagentes. O mesmo aconteceu com Marinho e Mathias (1996) e Schäfer et al., (1997), que não detectaram ovinos reagentes nos estados de São Paulo e Santa Catarina, respectivamente.

Os resultados mostram que no Brasil a brucelose em ovinos causada pela *B. ovis* encontra-se bastante disseminada. Em relação ao sexo dos animais, Marinho & Mathias (1996), no estado de São Paulo, observaram que, dos 183 ovinos testados pela prova de IDGA para pesquisa de anticorpos anti-*Brucella ovis*, 20,8% (38/183) eram machos e 79,2% (145/183) eram fêmeas. Dos 38 machos, apenas um (2,63%) foi positivo e, das 145 fêmeas, cinco (3,44%) foram positivas. Na presente pesquisa a maioria dos animais testados nas três propriedades eram fêmeas, visto que em cada propriedade havia apenas um macho reprodutor. Entretanto a relação entre a

positividade e o sexo não apresentou diferença estatística significante ( $p = 1,00$ ), corroborando com os achados de Azevedo et al., (2004), que ao analisarem 115 soros de ovinos do Rio Grande do Norte, não observaram significância estatística entre a positividade e o sexo, o que indica que machos e fêmeas estão igualmente expostos ao risco de infecção.

O exame clínico realizado nos machos das 3 propriedades não revelou alterações nos epidídimos, sugestivos de infecção por *B. ovis*. Azevedo et al. (2004) evidenciaram 20,8% de positividade nos carneiros testados, porém os mesmos não apresentaram lesões testiculares macroscópicas. Por outro lado, Ramos et al., (1966) no Rio Grande do Sul diagnosticaram 7,3% em 3317 carneiros que apresentavam epididimite clínica. O mesmo ocorreu com Magalhães Neto & Gil-Turnes (1996), também no Rio Grande do Sul, onde de 160 carneiros positivos para o teste de IDGA, num total de 1638 machos, encontraram 9,8% que apresentavam manifestações clínicas.

Nenhum dos reprodutores nesta pesquisa foi positivo aos testes. Na propriedade onde ocorreu a positividade à *B. ovis*, a contaminação das fêmeas do rebanho pode ter ocorrido pelo contato com carneiros que foram descartados e não foram avaliados.

Testes moleculares baseados em PCR podem ser considerados uma alternativa para os entraves apresentados pelo isolamento bacteriano, uma vez que têm demonstrado ser mais rápidos e mais sensíveis que os métodos tradicionais de diagnóstico (BRICKER, 2002).

Utilizando a PCR convencional, Costa et al., (2012) testaram amostras de urina e soro de noventa carneiros oriundos de 31 propriedades das quais quatro foram positivas, sendo que dezoito (20%) amostras de urina foram positivas pela PCR, enquanto o método de IDGA identificou 16 (17,8%) carneiros soropositivos.

Além do PCR denominado convencional, diversos autores vêm desenvolvendo o diagnóstico da infecção por *Brucella* através da técnica de PCR em tempo real. Este método diagnóstico possui as vantagens de execução mais rápida e fácil, limitar a possibilidade de contaminação do DNA utilizado e permitir a quantificação dos produtos de DNA avaliados (BOUNAADJA, et al., 2009).

Muitos autores têm realizado ensaios utilizando a PCR em tempo real para detecção de *Brucella* spp. (HINIC, 2008). Porém Mustaca et al., (2015) fez o primeiro relato de *B. ovis*-específico utilizando a PCR em tempo real. O diagnóstico especie-específico de *B. ovis* em carneiros é extremamente importante para diferenciação de outras espécies de *Brucella* com alto potencial zoonótico (i.e. *B. melitensis*) que podem também infectar carneiros. Desta forma, o diagnóstico diferencial entre *B. ovis* e *B. melitensis* em ovinos tem uma importância significativa em saúde pública.

Das 30 amostras analisadas para a PCR em tempo real neste estudo, 3(10%) foram positivas para *B. ovis*, sendo as mesmas positivas também para o IDGA, não demonstrando diferenças significativas ( $p = 1,00$ ) de positividade em relação ao teste utilizado (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de ovinos reagentes (valores relativos e absolutos) na pesquisa de anticorpos anti-*Brucella ovis* pelo teste de IDGA e PCR em tempo real, na região do Alto Paranaíba, MG.

Resultados	IDGA	(%)	qPCR	(%)
Positivos	3	10	3	10
Negativos	27	90	27	90
Total	30	100	30	100

A propriedade onde ocorreram os resultados positivos para brucelose, possui um histórico de casos de neosporose e toxoplasmose, tornando-se, portanto, necessário o monitoramento e diferenciação desses agentes, para controle da sanidade reprodutiva do rebanho.

### **Conclusões**

1. Foi constatada a presença de ovinos positivos para *Brucella ovis* em uma das propriedades avaliadas na região do Alto Paranaíba, MG.
2. São necessários estudos complementares para a elucidação da epidemiologia da *B. ovis* e implantação de medidas de controle adequadas.
3. Deve-se conscientizar os criadores, através de programas de educação sanitária na prevenção e erradicação da enfermidade de suas propriedades.

### **Referências**

AFZAL, M.; KIMBERLING, C.V. How to control *Brucella ovis* - induced epididymitis in rams. **Veterinary Medicine**, v.81, p.364-370, 1986.

AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; BATISTA, C.S.A.; CLEMENTINO, I.J.; SANTOS, F.A.; ALVES, F.A.L. Ocorrência de anticorpos anti- *Brucella ovis* em ovinos procedentes de quatro municípios do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Agropecuária Técnica**, v.25, n.2, p.45-50, 2004. DOI: 10.1590/1808-1657001072012

BAIGÚN, R.; CONIGLIARO, A.S.; LUNA, F. Aislamiento de *Brucella ovis* y control de reaccionantes serológicos en epididimitis ovina. **Veterinaria Argentina**, v.17, p.103-107, 2000.

BLASCO, J.M. *Brucella ovis*. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. (Eds). **Animal Brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p.351-378.

BOUNAADJA, L.; ALBERT, D.; CHÉNAIS, B.; et al. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcsp31 and pertarget genes. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n.1-2, p. 156-164, 2009. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.12.023

CARVALHO JUNIOR, C. A.; XAVIER, M. N.; COSTA, L. F.; SILVEIRA, S. S.; SANT'ANNA, F. M.; BORGES, A. M.; GOUVEIA, A. M. G.; SANTOS, R. L. Agentes infecciosos que podem romover infertilidade em machos da espécie ovina. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 34, n. 3, p. 160-167, 2010.

CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; PAULIN, L.M.; MEDEIROS, K.A. Inquérito soro-epidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.137-143, 2007.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007000400002>

COSTA, E.A.; SANT'ANA, F.M.; CARVALHO, C.J.S. et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the state of Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.751-754, 2012. DOI.org/10.1590/S0102-09352012000300029.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W.; BRIGGS, G.D. Pathology of reproductive tracts of Merino rams in north western Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.66, n.8, p.262-264, 1989. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1989.tb13587.x.

MAGALHÃES NETO, A.; GIL-TURNES, C. Brucelose ovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.2/3, p.75- 79, 1996.

MARINHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de anticorpos contra *Brucella ovis* em ovinos do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, n.2/3, p.45-48, 1996.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, C.P. **Doenças Infeciosas em animais de produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, 1294 p.

MENDONÇA, C. E. D.; MUNHOZ, A.; BEZERRA, R. A.; GUIMARÃES, L. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; MELO, C. B. *Brucella ovis* em ovinos: soropositividade e fatores de risco. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, p.1-9, 2017. DOI: 10.1590/1809-6891v18e-41635.

MOUSTACA, V. S.; SILVA, T. M. A.; COSTA, L. F.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Real-time PCR for detection of *Brucella ovis* and *Histophilus somni* in ovine urine and sêmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.6, p.1751-1755, 2015. DOI.org/10.1590/1678-4162-8038.

NIILIO, L.; MACDONAL, D.W.; GODKIN, G.F.; STONE, M.V. Ovine brucellosis in Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.27, n.6, p. 245-249, 1986.

NOZAKI, C.N.; MEGID, K.C.; SILVA JUNIOR, F.F.; VELOSO, C.S. Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar e ELISA no diagnóstico de brucelose ovina em cabanhas da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, n.1, p.1-5, 2004.

RAMOS, A.A.; MIES FILHOS, A.; SCHENCK, J.A.P.; VASCONCELLOS, L.D.; PRADO, O.T.G.; FERNANDES, J.C.T.; BLOBEL, H. Epididimite ovina, levantamento clínico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.211-213, 1966.

RIDLER, A.L.; WEST, D.M. Control of *Brucella ovis* infection in sheep. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 27, n.1, p.61-66, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.013>

ROBLES, C.A. **Brucellosis de los carneros por *Brucella ovis***. Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA, EEA Bariloche, 2008. 27p.

SALABERRY, S. R. S.; PAULIN, L. M.; SANTANA, R. L.; CASTRO, J. R.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella ovis* em ovinos no município de Uberlândia, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.1022-1024, 2011.  
Doi.org/10.1590/S0102-09352011000400032.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n.1–2, p. 69–81, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00129-9)

SILVA, J.B.A.; FEIJÓ, F.M.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; SILVA, J.S. Prevalência de brucelose ovina causada por *Brucella ovis* em rebanhos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal**, v.13, n.1, p.51-54, 2003.

WEST, D.M.; STAFFORD, K.J.; ALLEY, M.R.; Serological and necropsy findings for rams infected with *Brucella ovis* which were not identified by the complement fixation test. **New Zealand Veterinary Journal**, v.41, n.2, p.82-86, 1993. DOI:[org/10.1080/00480169.1993.35740](https://doi.org/10.1080/00480169.1993.35740).

## **Capítulo 5 – Considerações finais**

Apesar da importância que a ovinocultura e caprinocultura vem assumindo nas últimas décadas no Brasil, as questões sanitárias dessa criações são muitas vezes negligenciadas.

Várias enfermidades ocorrentes em caprinos e ovinos, são citadas no PNSCO Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos e algumas são de notificação oficial, porém apenas a brucelose causada pela *Brucella ovis*, causadora da epididimite ovina é contemplada pelo programa.

Esperava-se maior prevalência de brucelose em caprinos e ovinos na região do Alto Paranaíba, visto que não há um controle efetivo da sanidade nos rebanhos, porém levantamentos epidemiológicos são extremamente importantes para a prevenção e controle desta enfermidade, devido a questão zoonótica, onde a *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* podem ser transmitidas pelo leite, pelo contato direto ou indireto com animais infectados e manipulação de carcaças e vísceras no abate sanitário.

Salienta-se que diferentemente dos bovinos, caprinos e ovinos não são vacinados contra a brucelose em nosso país. Isso é preocupante visto que esses animais convivem de forma frequente com bovinos que podem estar contaminados.

Apesar de não ser caracterizada como zoonose a brucelose ovina causada pela *B. ovis* causa problemas reprodutivos sérios nos rebanhos, comprometendo a produção e causando prejuízos econômicos.

Mesmo que a brucelose ovina e caprina causada por *Brucella melitensis*, não tenha sido diagnosticada no Brasil, é importante que haja registros e documentações do status sanitário desse animais em relação à brucelose, tanto pelo risco de contaminação em humanos quanto pela comercialização de animais.

## Anexo I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Diagnóstico da brucelose caprina e identificação do DNA de *Brucella abortus*, *Brucella ovis* e *Brucella melitensis* em sêmen, leite e sangue de caprinos na região do Alto Paranaíba, MG", protocolo nº 016/17, sob a responsabilidade de Anna Monteiro Correia Lima – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 09 de junho de 2017.

(We certify that the project entitled "Diagnóstico da brucelose caprina e identificação do DNA de *Brucella abortus*, *Brucella ovis* e *Brucella melitensis* em sêmen, leite e sangue de caprinos na região do Alto Paranaíba, MG", protocol 016/17, under the responsibility of Anna Monteiro Correia Lima - Involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - Is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 09th, 2017).

Vigência do Projeto	Inicio: 30/06/2017 Término: 15/07/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Caprinos
Número de animais	55
Peso / Idade	35 – 65 kg / 12 meses a 6 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Fazenda
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 13 de junho de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFG

Anexo II – Normas da Revista Ciência Rural para submissão do artigo: Detecção de *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* em leite caprino pela PCR em tempo real.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### Objetivo e política editorial

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

### Preparação de originais

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações.** Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. **Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

**4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

**5. A nota deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e**

**animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo.doc, pdf).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista ([www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr)).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

**9.1.** Citação de livro:  
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery.** Philadelphia: Saunders, 1985. 2v.  
TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros.** Manaus: INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:  
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques.** 3.ed. New York: John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte.** São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:  
Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

#### 9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

#### 9.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad).** 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose.** São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Artroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings....** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital**, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via

base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominadas figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os **desenhos figuras e gráficos** (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos **300 dpi** em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do (s) autor (es).

**12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados.

**13.** Lista de verificação (Checklist [pdf](#) ou [doc](#))

**14.** A taxa de **tramitação** é de R\$ 80,00 e a de **publicação** é de R\$ 100,00 por página impressa. **A taxa de publicação somente deverá ser paga após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores.** Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de R\$ 600,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página.

Os **pagamentos** poderão ser efetuados por:

**a)** Transferência/depósito no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 36.189-5 em nome da FATEC (CNPJ: 89.252.431/0001-59) - Projeto 96945. **A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação**, podendo ser enviada via fax (55 3220 8695/3220 8698) ou ainda enviado por email ([cienciarural@mail.ufsm.br](mailto:cienciarural@mail.ufsm.br)) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura).

**b)** Solicitação de fatura ([.doc](#) ou [.pdf](#)). Nessa modalidade o formulário disponível deverá ser encaminhado devidamente preenchido via e-mail ou fax (55 3220 8695/3220 8698) para que possamos encaminhar a solicitação a Fundação que administra os nossos recursos e esta encaminhará a fatura ao

endereço especificado no formulário.

c) O pagamento da taxa de tramitação também pode ser feito por meio online através de **cartão de crédito (VISA)** através deste [link](#)

**15.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**16.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

**17.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

#### **Critérios de avaliação**

Todos os trabalhos submetidos são inicialmente examinados pela equipe CR, comitê editorial e de área e então enviados a dois avaliadores ad hoc no mínimo. As revisões são submetidas normalmente para três consultores ad hoc.

Anexo III – Normas da Revista Semina: Ciências Agrárias para submissão do artigo:  
Investigação de *Brucella ovis* por PCR em tempo real em semen ovino commercial.

### **Normas editoriais para publicação na Semina: ciências agrárias**

A revista Semina: Ciências Agrárias, com periodicidade trimestral, é uma publicação de divulgação científica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Tem como objetivo publicar artigos, comunicações, relatos de casos e revisões relacionados às Ciências Agronômicas, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Medicina Veterinária, Zootecnia e áreas afins.

#### **Categorias dos Trabalhos**

- a) Artigos científicos: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) Artigos de revisão: no máximo 35 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

#### **Apresentação dos Trabalhos**

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português, inglês ou espanhol e devem ser enviados em três cópias impressas em papel A4, com espaçamento duplo, elaborado no editor de texto Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 12 normal, com margens esquerda e direita de 2,5 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem estar separadas no final do trabalho. As figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões. As legendas das figuras deverão ser colocadas em folha separada obedecendo à ordem numérica de citação no texto. Fotografias devem ser identificadas no verso e desenhos e gráfico na parte frontal inferior pelos seus respectivos números do texto e nome do primeiro autor. Quando necessário deve ser indicado qual é a parte superior da figura para o seu correto posicionamento no texto.

#### **Preparação dos manuscritos**

##### **Artigo científico:**

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras); Abstract com Key-words (no máximo seis palavras); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final ou Resultados, Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser escritos em letras maiúsculas e minúsculas e destacados em negrito, sem numeração. Quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem receber números arábicos. O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo de congresso, nota prévia ou formato reduzido.

**Na primeira página do manuscrito devem constar as seguintes informações:**

*1. Título do trabalho:* O título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descriptivo, contendo palavras que permitam ao leitor ter uma idéia do conteúdo do artigo.

*2. Nomes dos autores:* Deverão ser escritos por extenso, separados por ponto e vírgula, logo abaixo do título do trabalho. A instituição, os órgãos de fomento e a identificação dos autores deverão ser feitos por inserção numérica de notas de rodapé ao final do título e dos nomes. O autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e E-mail deverá ser destacado com um asterisco sobrescrito junto ao seu número de identificação.

A partir da segunda página do manuscrito a apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

*1. Título do trabalho*, acompanhado de sua tradução para o inglês.

*2. Resumo e Palavras-chave:* Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 150 e um máximo de 300 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

*3. Introdução:* Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

*4. Material e Métodos:* Poderá ser apresentado de forma descriptiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

*5. Resultados e discussão com conclusões ou Resultados, Discussão e Conclusões:* De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

*6. Agradecimentos:* As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

#### **Observações:**

Quando for o caso, antes das referências, deve ser informado que o artigo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biosegurança e ética.

*Notas:* Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

*Figuras:* Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

*Tabelas:* As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

*Grandezas, unidades e símbolos:* Deverá obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

*7. Citações dos autores no texto:* Deverá seguir o sistema de chamada alfabetica escrita com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

Os resultados de DUBEY (2001) confirmam que o.....

De acordo com SANTOS et al. (1999), o efeito do nitrogênio....

Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica....

.....e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).

.....comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

*8. Referências Bibliográficas:* As referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabetica no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados,

independentemente do número de participantes (única exceção à norma – item 8.1.1.2). A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

### **Comunicação científica**

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologia completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a seqüência – introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas.

### **Relato de caso**

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, achados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agronômico, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

### **Artigo de revisão bibliográfica**

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os colaboradores poderão ser convidados a apresentar artigos de interesse da revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusão; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

### **Outras informações importantes**

1. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na Semina Ciências Agrárias, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.
2. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica “*Ad hoc*” e da aprovação do Comitê Editorial da Semina Ciências Agrárias, UEL.
3. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/proppg/semina>).
4. Os trabalhos não aprovados para publicação serão devolvidos ao autor.
5. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.
6. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

Universidade Estadual de Londrina  
Centro de Ciências Agrárias  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias  
Campus Universitário - Caixa Postal 6001 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

## Anexo V – Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira para submissão do artigo: Diagnóstico da *Brucelaovis* em rebanhos ovinos pela PCR em tempo real

### Diretrizes para Autores

#### **Escopo e política editorial**

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

As submissões de artigos científicos, notas científicas e revisões (a convite do editor) devem ser encaminhadas via eletrônica e, **preferencialmente**, em inglês. No entanto, aqueles encaminhados em português ou espanhol terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o inglês** antes de serem publicados. **As despesas de tradução serão de responsabilidade dos autores.**

#### **Análise dos artigos**

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

#### **Forma e preparação de manuscritos**

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e

linhas numeradas.

### **Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos**

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ...., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

### **Como fazer:**

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### **Título**

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### **Nomes dos autores**

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

### **Endereço dos autores**

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### **Resumo**

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

### **Introdução**

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

## **Resultados e Discussão**

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

## **Conclusões**

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

## **Agradecimentos**

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

## Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)  

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**.Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.
- Artigos de periódicos  

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre Bradyrhizobium japonicum, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.
- Capítulos de livros  

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

## Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

## Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

### **Notas Científicas**

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

#### Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
  - Resumo com 100 palavras, no máximo.
  - Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
  - Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

### **Outras informações**

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: [sct.pab@embrapa.br](mailto:sct.pab@embrapa.br) ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

## Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.
6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.