

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MARCOS ALEXANDRE DE OLIVEIRA

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS
COLETIVAS DE LEITE BOVINO

UBERLÂNDIA

2014

MARCOS ALEXANDRE DE OLIVEIRA

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS

COLETIVAS DE LEITE BOVINO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Área De Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia Lima

UBERLÂNDIA

2014

MARCOS ALEXANDRE DE OLIVEIRA

**DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS
COLETIVAS DE LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada á Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Área De Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia Lima

Uberlândia, 03 dezembro de 2014

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Luis Antonio Mathias – UNESP

Dra. Ana Cláudia A. M. Pajuaba Imunologia e Parasitologia Aplicadas- UFU

Prof. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros – UFU (suplente)

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

O48d
2014 Oliveira, Marcos Alexandre de, 1981-
 Diagnóstico de Brucelose em amostras coletivas de leite bovino /
 Marcos Alexandre de Oliveira. - 2014.
 85 f. : il.

 Orientador: Anna Monteiro Correia Lima.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Brucella - Teses. 3. Leite - Teses.
 4. Bovino - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Universidade
 Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou tudo isto possível.

Aos meus pais, Geraldo e Ana, e meus irmão, Kelia e Carlos, pelo amor incondicional, exemplos, motivação e carinho.

À minha esposa Priscilla, pelo amor, companheirismo e paciência.

À Professora Doutora Anna Lima, minha orientadora, pelo conhecimento e oportunidade de crescimento pessoal, pelo apoio, orientação e paciência em todo o processo de elaboração deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU, Mariana, Danilo, Bruno, Silvia e Andréia, por toda ajuda, incentivo e conhecimentos que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

À Andréa Leão Carneiro Frezza, pela doação do Kit de ELISA da IDEXX e pela colaboração na realização dos exames.

A todos os produtores que de alguma forma estão presentes nesta dissertação, com seus

esforços e contribuição, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado,

A CAPES e ao CNPq, pela concessão do apoio financeiro.

A todos os meus familiares, amigos, professores e técnicos da Universidade Federal de Uberlândia que acreditaram e de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

TUDO EM SEU LUGAR

*Navegue, descubra tesouros, mas não os tire do fundo do mar, o lugar deles é lá.
Admire a lua, sonhe com ela, mas não queira trazê-la para a terra.
Curta o sol, se deixe acariciar por ele, mas lembre-se que o seu calor é para todos.
Sonhe com as estrelas, apenas sonhe, elas só podem brilhar no céu.
Não tente deter o vento, ele precisa correr por toda parte, ele tem pressa de chegar
sabe-se lá onde.
Não pare a chuva, ela quer cair e molhar muitos rostos, não pode molhar só o seu.
Descubra-se todos os dias, deixe-se levar pelas vontades, mas não enlouqueça por
elas.
Procure, sempre procure o fim de uma história, seja ela como for.
Acelere seus pensamentos, mas não permita que eles te consumam.
Abasteça seu coração de fé, não a perca nunca.
Mergulhe de cabeça em seus desejos e satisfaça-os.
Arrependa-se, volte atrás, peça perdão.
Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperança, mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca! Se achá-lo, segure-o!*

Fernando Pessoa

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM LEITE EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE BOVINO

RESUMO

A dissertação foi dividida em três estudos. O primeiro objetivou verificar a existência de correlação entre altas contagens de células somáticas e reações positivas no Teste do anel em leite (TAL). Foram coletadas 181 amostras de leite oriundas de tanques de expansão provenientes de diferentes propriedades rurais e submetidas ao Teste de Anel em Leite (TAL). Também foi realizada a contagem de células somáticas (CCS) através do método de citometria de fluxo. O TAL resultou em 11 amostras positivas (6%), das quais, 5 (45,4%) encontravam-se na faixa de 6×10^5 cel/mL. Os resultados das análises demonstraram não haver associação estatística entre altas contagens de células somáticas e reações positivas no Teste de Anel em Leite. O segundo estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de um kit de teste imunoenzimático indireto (ELISA) para diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite. Amostras de leite in natura, totalizando 181, foram submetidas ao teste ELISA indireto. O teste ELISA identificou 42 (23,2%) amostras positivas, 11 (6%) suspeitas e 128 (70,7%) negativas. Para comparação foi utilizado o TAL. O ELISA apresentou sensibilidade de 72,7%, especificidade de 78,6% e um índice de concordância Kappa de 0,22. Posteriormente 9 rebanhos foram selecionados para realização de testes individuais de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol 2(ME), por meio de amostragem aleatória dos animais em lactação. Foram encontrados animais reagentes apenas em rebanhos considerados positivos no TAL e no ELISA simultaneamente. Constatou-se que o teste ELISA apresentou valores de sensibilidade e especificidade inferiores aos relatados em outros países onde o teste ELISA já é utilizado, assim como foi confirmada a existência de focos de brucelose em rebanhos leiteiros. No terceiro estudo, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi empregada para detecção de *Brucella abortus* em amostras de leite in natura. Foram selecionadas 90 amostras para realização da técnica de PCR, sendo 8 positivas no TAL, 37 positivas no ELISA, 11 suspeitas no ELISA e 34 negativas em ambos os testes. A extração foi realizada por meio de lise enzimática, seguida de amplificação utilizando primers

BAB e IS 711, que amplificam fragmentos de 498 pares de bases. A visualização foi realizada utilizando gel de agarose 1% em fotodocumentador Alpha Digi Doc. Não foi amplificado DNA de *Brucella abortus*, demonstrando a PCR não se a melhor técnica para o diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite.

Palavras-chave: *Brucella*. ELISA. PCR. Células somáticas. Teste anel em leite.

DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN MILK USING COLLECTIVE MILK SAMPLES

ABSTRACT

The dissertation was divided in three studies. Our first study determined the correlation between high somatic cell counts and positive milk ring tests (MRT). The milk ring test was performed on 181 milk samples from expansion tanks located at various rural sites in the regions of Brazil. Somatic cell counts (SCC) via flow cytometry were also performed. MRT identified 11 positive samples (6%) where the majority were reactive and 5 (2.8%) were found in the 6×10^5 cel/mL range. The results showed that there was no statistical relationship between high somatic cell counts and positive milk ring tests. Our second study evaluated the efficiency of an enzyme linked immunosorbent assay kit (ELISA) in diagnosing brucellosis in collective milk samples. The indirect ELISA test was used on 181 samples of fresh milk and identified 42 positive, 11 suspect and 128 negative samples. These results were compared to the MR test, the only test approved for collective milk samples by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). The ELISA test had sensitivity of 72.7%, specificity of 78.6% and a Kappa concordance index of 0.22. Subsequently, random samples from lactating animals in nine herds were tested individually by the rose Bengal test (RBT) and the 2-mercaptoethanol 2(ME) tests. Positive animals were found only in herds that tested positive in both ELISA and MRT. The ELISA test was neither as sensitive nor as specific as reported in other countries where the ELISA test is used and where brucellosis outbreaks have been confirmed in dairy herds. Our third study used the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to detect *Brucella abortus* in samples of fresh milk. Ninety samples were preselected for the PCR test including 45 that tested positive in ELISA and/or MRT, 11 suspect in ELISA and 34 negative in both tests. Extraction was carried out by enzymatic lysis followed by amplification using BAB and IS 711 primers, which amplify fragments of 498 base pairs. Visualization was accomplished with 1% agarose gel and an Alpha Digidoc Photo Documentation system. *Brucella abortus* DNA was not amplified in any of the samples, demonstrating that PCR is not the best screening technique for brucellosis in milk

samples at the herd level, given that these microorganisms do not always escape into the milk.

Keywords: *Brucella*. ELISA. PCR. Somatic cells. Milk ring test.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	=	micrograma
µg/mL	=	Micrograma por mililitro
µL	=	microlitro
cm	=	centímetros
CCS	=	contagem de células somáticas
CMT	=	California mastitis test
dATP	=	desoxi-adenosina trifosfato
dCTP	=	desoxi-citosina trifosfato
dGTP	=	desoxi-guanosina trifosfato
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	desoxirribonucleotídeos
dTTP	=	desoxi-timidina trifosfato
EDTA	=	Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	=	e colaboradores
g	=	gramas
HCl	=	ácido clorídrico
KDa	=	kilodalton
L	=	litro
LPS	=	lipopolissacarídeos
M	=	molar
MAPA	=	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	=	miligrama
MgCl ₂	=	cloreto de magnésio
mL	=	mililitro
mM	=	milimolar
NaCl	=	cloreto de sódio
Nº	=	número
°C	=	Celsius
p/v	=	peso/volume
pb	=	pares de base

PCR	=	reação em cadeia pela polimerase
pH	=	potencial hidrogeniônico
PK	=	proteínase K
pmol	=	picomoles
RNA	=	ácido ribonucleico
rpm	=	rotações por minuto
SDS	=	dodecil sulfato de sódio
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-Borato-EDTA
TE	=	tampão TRIS-EDTA
TRIS	=	Tris (hidroximetil) aminometano
UI	=	unidade internacional
V	=	volts
x g	=	múltiplos da gravidade terrestre (9,81m/s ²)
X	=	vezes

SUMÁRIO

CAPÍTULO – 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1	Brucelose bovina.....	13
1.2	Etiologia.....	15
1.3	Patogenia.....	17
1.4	Brucelose e Cadeia Agroindustrial do leite.....	18
1.5	Vacinas contra brucelose bovina.....	20
1.6	Controle da brucelose bovina	22
1.7	Diagnóstico da brucelose bovina	23
	Referências.....	27

CAPÍTULO 2 - CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E REAÇÕES POSITIVAS NO TESTE DE ANEL EM LEITE DA BRUCELOSE EM REBANHOS LEITEIROS

	Resumo.....	33
	Abstract.....	34
2.1	Introdução.....	35
2.2	Materiais e Métodos.....	36
2.3	Resultados e Discussão	37
2.4	Conclusão.....	39
	Referências.....	41

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE

	Resumo.....	44
	Abstract.....	45
3.1	Introdução	46
3.2	Testes de Diagnóstico	47
3.2.1	ELISA.....	48
3.2.2	Testes sorológicos.....	49
3.2.3	AAT e 2-Mercaptoetanol.....	49
3.3	Materiais e Métodos.....	50
3.3.1	Local	50
3.3.2	Animais	50

3.3.3	Amostra de Leite.....	50
3.3.4	Amostra de Soro.....	50
3.3.5	ELISA.....	51
3.3.6	Cálculo do índice de Reatividade.....	52
3.3.7	AAT e 2 Mercaptoetanol.....	52
3.4.1	Antígenos.....	52
3.5	Análise Estatística.....	53
3.5.1	Amostragem de leite in natura em tanques de expansão.....	53
3.5.2	Amostragem sorológica individual.....	53
3.5.3	Cálculos estatísticos.....	54
3.6	Resultados	55
3.6.1	ELISA e TAL.....	55
3.6.2	Sensibilidade.....	58
3.6.3	Especificidade.....	58
3.6.4	Valor Preditivo Positivo.....	58
3.6.5	Valor Preditivo Negativo.....	58
3.6.6	Avaliação da concordância dos ensaios iELISA e TAL pelo índice Kappa.....	58
3.6.7	Quantidade de animais por rebanho.....	59
3.6.8	AAT E 2- Mercaptoetanol.....	59
3.7	Discussão.....	60
4	Conclusão.....	63
	Referência.....	64

CAPÍTULO 4 – REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE

	Resumo.....	68
	Abstract.....	69
4.1	Introdução.....	70
4.2	Materiais e Métodos.....	72
4.2.1	Amostragem	72
4.2.2	Extração de DNA.....	73
4.2.3	Controle Positivo.....	74
4.2.4	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	74
4.3	Resultados	75

4.4	Discussão.....	76
4.5	Conclusão.....	78
	Referências.....	79
	 CAPITULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	Apêndice A - Estatística Capítulo 2.....	82
	Apêndice B- Estatística Capítulo 3.....	83
	Anexo Aprovação comitê de Ética na Utilização de Animais UFU.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre a contagem de células somáticas (CCS) e resultado no teste de anel em leite (TAL) para brucelose em 181 amostras coletivas de leite .	38
Tabela 2	Provas sorológicas para brucelose associadas às classes de imunoglobulinas que detectam.	48
Tabela 3	Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa (k) de acordo Segundo Pereira 2007	54
Tabela 4	Comparação entre ELISA indireto e teste de anel em leite (TAL) para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite.	57
Tabela 5	Quantidade de vacas em lactação por rebanho, de 181 amostras coletivas de leite	59
Tabela 6	Resultados de testes sorológicos para brucelose realizados em 9 rebanhos leiteiros 2014	60
Tabela 7	Sequência dos “primers” utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de <i>Brucella abortus</i>	74
Tabela 8	Programa utilizado para amplificação do fragmento de DNA de <i>Brucella abortus</i>	75

LISTA DE QUADROS

Quadro-1	Esquema para coleta de amostra de sangue em bovinos submetidos ao teste de anel em leite e ao teste ELISA indireto para amostras coletivas de leite bovino	53
-----------------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Prevalência de focos de brucelose nas Unidades Federativas brasileiras	19
Figura 2	Fluxograma de ações executadas durante a realização da pesquisa	37
Figura 3	Resposta dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de <i>Brucella abortus</i> ou vacinados com B19	47
Figura 4	Densidade Óptica de 181 amostras coletivas de leite bovino analisadas pelo kit ELISA para diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite.	55
Figura 5	Resultado de análise do Índice de Reatividade (IR) de 181 amostras coletivas de leite bovino submetidas ao ELISA para diagnóstico de brucelose.	56
Figura 6	Resultados do teste de anel em leite (TAL) para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite bovino	56
Figura 7	Resultados do teste de anel em leite (TAL) para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite bovino	57
Figura 8	Resultado obtido por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de leite bovino <i>in natura</i> provenientes de tanques de expansão	76

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Brucelose Bovina

A brucelose bovina é uma doença infecciosa de origem bacteriana que possui como agente causador predominante a *Brucella abortus*, sendo responsável por abortos nos estágios finais da gestação, assim como altas taxas de infertilidade (ALTON; JONES; PIETZ, 1976). A doença apresenta-se como uma enfermidade de evolução crônica, caráter infeccioso, altamente transmissível e com alto potencial zoonótico, acometendo preferencialmente fêmeas em idade de reprodução e eventualmente machos.

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos capazes de sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos devido a sua habilidade em escapar do sistema imune do hospedeiro (PAULIM; FERREIRA NETO, 2003). A bactéria tem predileção por tecidos com alta disponibilidade de alguns elementos como o eritritol, um hidrato de carbono que desempenha importantes funções no metabolismo da *Brucella*, sendo encontrado em alta concentração no útero gravídico, nos tecidos mamários, osteoarticulares e nos órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal, OIE (2003), as enfermidades infecciosas, entre elas a brucelose, representam um grande empecilho ao comércio internacional de produtos de origem animal, constituindo-se em um fator limitante à bovinocultura e privando muitos pecuaristas de atingir mercados internacionais.

Essa enfermidade apresenta grande impacto econômico devido a redução de índices zootécnicos, queda na produção e descarte precoce de animais em pleno período produtivo. Porém os custos relativos da brucelose não se limitam a perdas nos índices reprodutivos e nos descarte precoce de animais, mas também devido a sérias restrições comerciais de países potencialmente consumidores.

As perdas econômicas causadas pela brucelose são grandes, mas o real impacto financeiro é difícil de estimar. Embora na maioria dos países onde a doença se encontra presente existam programas de controle e erradicação que obrigam a notificar as autoridades de saúde animal, esses números oficiais podem representar

apenas frações da verdadeira ocorrência da enfermidade (SELENN; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

A brucelose assume também importância em saúde pública, devido aos riscos que representa para os trabalhadores que compõem determinados grupos ocupacionais como tratadores, veterinários, margarefes e laboratoristas (RAMOS et al., 2008).

O contato direto e indireto com animais infectados, a exposição acidental em laboratórios em que se trabalha com o agente e o consumo de alimentos lácteos contaminados constituem as principais formas de contágio da doença em humanos (MARIANELLI et al., 2007). Desta forma, o risco de contágio por alimentos como leite não pasteurizado e a carne não deve ser negligenciado, haja vista a capacidade da *Brucella spp* de manter-se viável durante meses, sendo pouco afetada pela acidificação muscular, refrigeração ou congelamento. Além do calor, a eliminação do agente só ocorre em situações de pH inferior a 4 (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003).

A OIE demonstra preocupação com a brucelose, pois a severidade da doença, com efeito altamente debilitante quando acomete o homem, certamente justifica sua erradicação (CARVALHO-NETA et al., 2010; GODFROID et al., 2005). Em virtude desse fato, nos países onde a doença ainda ocorre, existe a necessidade de se estabelecerem programas com o intuito de seu controle e posterior erradicação.

O processo de erradicação da brucelose é complexo, estando sujeito a alterações devido a focos emergentes ou reemergentes, influenciados pelo aumento dos movimentos migratórios e pela crescente importação de produtos de origem animal (SELEEN; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). Deve-se levar em consideração o fato de que a prevalência da brucelose nos animais domésticos está intimamente relacionada com os animais selvagens, importantes reservatórios da doença (HERRERA et al., 2010). Poucos países como Áustria, Finlândia, Dinamarca, Alemanha e Holanda conseguiram efetivamente se livrar da doença, e ainda demandam grandes investimentos para que seja mantido este status (CUTLER; WHATMORE; COMMANDER, 2005; GODFROID 2002; LOPES et al., 2010)

O caráter intracelular da bactéria dificulta as medidas terapêuticas e conseqüentemente compromete o tratamento de animais infectados. Desta forma, as medidas preventivas, como a vacinação das fêmeas e o controle no trânsito de

animais, têm importância fundamental no combate à doença (ACHA; SZYFRES, 2003; LORD et al., 1998; POESTER, 1998; CAMPANÃ; GOTARDO; ISHIZUCA, 2003).

1.2 Etiologia e Epidemiologia

Algumas características inerentes ao gênero *Brucella* permitem classificá-las em dois grupos antigênicos distintos: *Brucella* de morfologia colonial lisa ou clássica e *Brucella* de morfologia rugosa. As bactérias com morfologia colonial lisa ou clássica (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) apresentam patogenicidade, porém quando evoluem para formas rugosas ou mucóide como *B. ovis* e *B. canis* deixam de ser patogênicas (BRASIL, 2006)

As *Brucella spp.* tem estrutura antigênica completa, sendo os antígenos mais importantes o lipopolissacarídeo–LPS, o hapteno nativo–HP, proteínas citoplasmáticas e proteínas de membrana externa (SANCHES et al., 2000). A composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular é responsável pela morfologia colonial da *Brucella* e o principal envolvido no desencadeamento dos fenômenos imunológicos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Altas densidades animais favorecem a difusão da infecção, particularmente após episódios de abortamento (NICOLETTI, 1980), assim como a compra de animais representa fator de risco para introdução da brucelose em propriedades livres, sendo o risco variável de acordo com a fonte da compra desses novos animais (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990).

As descargas uterinas assim como os produtos resultantes do aborto constituem o principal material de contaminação para o ambiente e consequente fonte de transmissão da *Brucella*, por meio de ingestão, lambedura ou pelo hábito dos bovinos de cheirar os genitais de outros bovinos (DIVERS; PEKK, 2008).

A transmissão de brucelose também pode ocorrer através do leite proveniente de vacas portadoras, que não apresentem sinais clínicos, assim como por meio de fezes provenientes de bezerros que ingerem o leite de vacas infectadas, tendo em vista que a *Brucella* possui capacidade de se albergar em linfonodos e serem excretadas ainda viáveis pelas fezes (ACHA; SZYFRES, 2003; DIAS, 2004, ENGLAND et al., 2004).

Desta forma, o pasto também pode ser considerado uma fonte de contaminação, devido às fezes de bezerros que se alimentam de leite contaminado, pois nem todas as bactérias são eliminadas durante a passagem pelo trato digestivo (ACHA; SZYFRES, 2003).

A constituição da parede celular da *Brucella* lhe assegura maior resistência ao meio ambiente, desta forma o sombreamento, as baixas temperaturas e a umidade elevam o período de sobrevivência da bactéria fora do hospedeiro (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A principal via de acesso da bactéria ao organismo é a mucosa do aparelho digestivo (via oral). A *Brucella* tem a capacidade de atravessar a barreira intestinal e por meio do sistema porta chegar a circulação sanguínea, onde é fagocitada pelos macrófagos. No interior destas células, inicia seu processo de multiplicação e posteriormente se encaminha aos tecidos de eleição (ACHA; SZYFRES, 2003; CAMPANÃ; GOTARDO; ISHIZUCA, 2003).

A transmissão pode ocorrer também de forma congênita, levando alguns desses animais a se tornarem portadores latentes. Nesses animais, a vacinação é ineficaz, constituindo um sério problema aos programas de controle da doença em rebanhos de baixa prevalência. A soroconversão desses animais pode ocorrer na metade da primeira gestação (ACHA; SZYFRES, 2003; BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994; TIMONEY et al., 1988).

Devido aos mecanismos de defesa uterina, o risco de transmissão venérea por meio de monta natural é muito baixo (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Ao contrário do que ocorre pela inseminação artificial, que apresenta elevado risco, pois a deposição do sêmen ocorre diretamente no colo uterino da vaca receptora, eliminando os mecanismos naturais de defesa presentes na vagina (VASCONCELLOS; ITO; CORTES, 1987).

Os animais castrados não representam fontes de infecção da brucelose bovina, porém constituem importante risco de transmissão da doença para o homem devido à cadeia produtiva da carne, que demanda a manipulação das carcaças durante o abate (BERR, 1988; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

1.3 Patogenia

Após a internalização da bactéria pelos macrófagos, estes se movem através dos vasos linfáticos e se deslocam pelos órgãos através da corrente sanguínea, instalando-se em baço, linfonodos, fígado, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

O mecanismo de permanência da *Brucella spp.* no interior de macrofágos está relacionado à síntese de enzimas antioxidantes e à produção de guanosina 5' monofosfato (GMP) e adenina durante o processo de fagocitose, o que por sua vez, impede a fusão do lisossomo com o fagossomo, impossibilitando a degranulação dos macrófagos e consequentemente a destruição do agente (ARESTÉGUI et al., 2001; BALDWIN; PARENT, 2002; CARVALHO-NETA et al., 2010).

O eritritol é encontrado nos tecidos osteoarticulares, mamários, órgão reprodutores masculino e feminino, e na placenta da vaca, onde ocorre grande quantidade desse hidrato de carbono, que estimula a multiplicação da *Brucella*, e contribui para a elevada suscetibilidade dos tecidos fetais dos bovinos. Nas vacas, a concentração de eritritol se altera de forma gradativa conforme o período gestacional, atingindo níveis máximos próximos ao parto, o que eleva a capacidade de infecção e multiplicação dos microrganismos na parte final da gestação (CARTER; CHENGAPPA, 1991; LAGE et al., 2008).

Ao atingir a placenta, a bactéria tem predileção pelo epitélio trofoblástico, resultando em placentite necrótica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; BRASIL, 2006). Essas lesões necróticas-inflamatórias placentárias levam ao comprometimento da circulação materno-fetal, impedindo a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando assim o aborto (ACHA; AZYFRES, 2003).

As bactérias em altas concentrações no âmnio podem levar a morte fetal, assim como a elevada quantidade de endotoxinas liberadas após a destruição da *Brucella*, leva a um processo inflamatório dos placentomas, que poderá culminar em necrose, lise de vilosidades, descolamento dos cotilédones e da carúncula. Em casos agudos, esse processo leva ao aborto, porém se a necrose não atingir a intensidade para desencadear o aborto, haverá uma grande deposição de fibrina entre as vilosidades, reduzindo o fluxo sanguíneo e produzindo crias fracas e consequentemente retenção placentária (ACHA; SZYFRES, 2003).

Após a expulsão do feto ocorre a migração da bactéria do útero em repouso

para outros órgãos ativos, como os linfonodos supramamários ou para a própria glândula mamária, desencadeando mastites crônicas sem lesões aparentes ou com características sugestivas de brucelose (BATHKE, 1988).

Nos machos, a *Brucella* pode localizar-se nos testículos e nas glândulas genitais anexas, provocando as seguintes manifestações clínicas: aumento de volume dos testículos, diminuição da libido e infertilidade (ACHA; SZYFRES, 2001).

Segundo Campanã, Gotardo e Ishizuca (2003) outros sinais clínicos podem ser observados como artrite no tarso e no metatarso ou poliartrite, tenosinovite, bursites e abscessos cutâneos. As lesões observadas nos fetos abortados são: edema de pele, no pericárdio e no cordão umbilical, transudato sero-hemorrágico nas cavidades torácica e abdominal e também no pericárdio.

Dentro da célula, a *Brucella* tem a capacidade de se replicar, desta forma a resposta imune mediada por células tem um importante papel nos fenômenos da relação hospedeiro- parasita, com destaque para os macrófagos, as citocinas tipo Th1 e as células citotóxicas (SALDARRIAGA; OSSA; RUGELES, 2002).

A resposta humoral dos bovinos contra a *Brucella abortus* consiste na produção de IgM, sendo sua duração dependente da via de exposição, da dose de bactéria e da condição sanitária do animal. Quase imediatamente após a resposta de IgM vem a produção de IgG1 e mais tardiamente menores quantidades de IgG2 e IgA. Devido a epítomos comuns presentes na camada lipopolissacarídea (LPS) da *Brucella lisa* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) todos os testes sorológicos utilizam o antígeno de *B. abortus* recomendado pelo Manual da OIE, enquanto que as espécies rugosas de *Brucella* são diagnosticadas utilizando antígenos específicos de cada espécie (NIELSEN, 2002).

1.4 Brucelose e Cadeia Agroindustrial do Leite

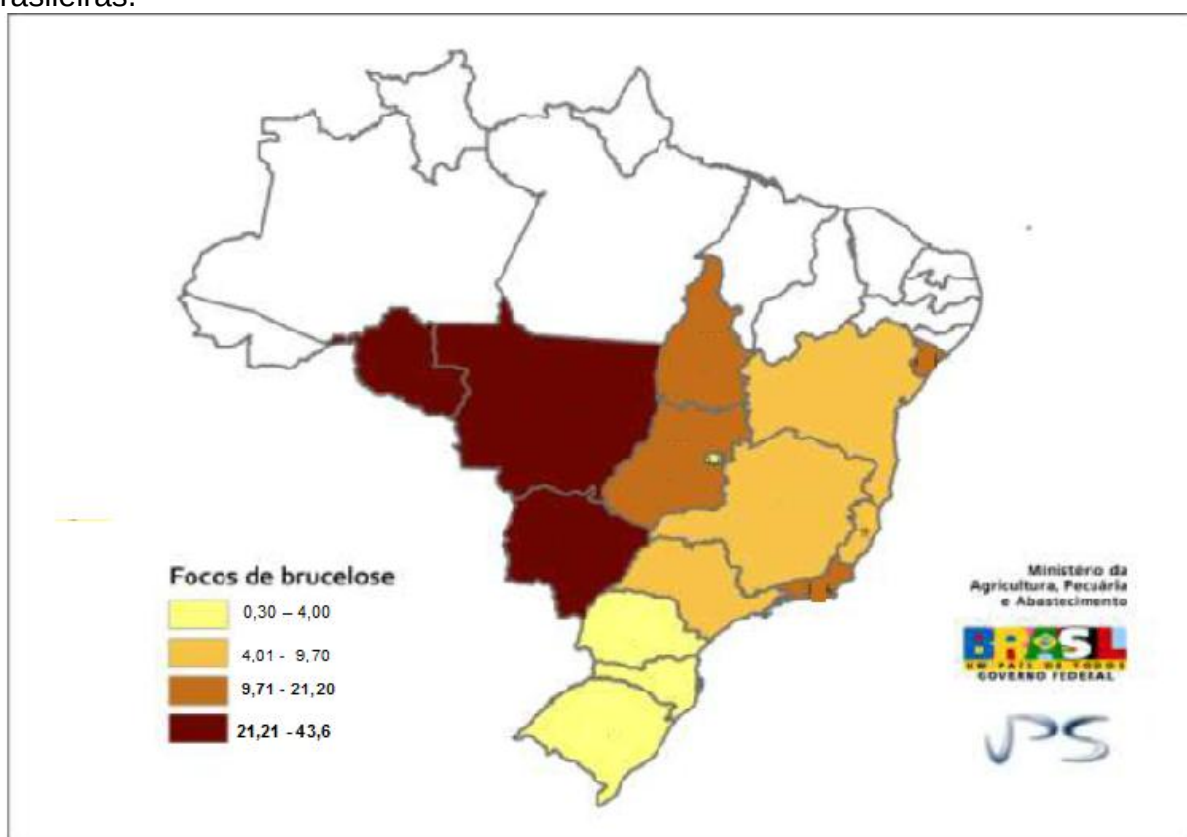
A produção de leite é uma atividade importante não apenas do ponto de vista econômico mas também social, auxiliando na fixação do homem no campo. O sistema de produção do leite passou por profundas transformações, exigindo dos produtores cada vez mais uma visão empresarial da atividade e um controle mais rígido em relação à produção e à qualidade do leite entregue as usinas de beneficiamento.

O crescimento do mercado do leite exige sistemas de produção intensivos,

eficientes e cada vez mais cientes da legislação sanitária e ambiental. O controle, a prevenção e a erradicação de doenças transmissíveis, os programas de boas práticas de fabricação e de redução de riscos são pontos fundamentais para que se obtenha uma produção segura e sustentável.

A brucelose bovina acomete animais em todo território nacional (Figura 1), mas sua prevalência e distribuição regionais ainda não são bem caracterizadas (FERREIRA-NETO 2009).

Figura 1 - Prevalência de focos de brucelose nas Unidades Federativas brasileiras.



Fonte: Ferreira Neto et al., 2009.

Segundo Garcia-Carrilo (1986), as perdas econômicas decorrentes da brucelose bovina são representados pela redução na produção de leite e carne, diminuição do valor dos animais e dos subprodutos. Ainda são acrescidos a estes os custos médicos inerentes ao tratamento das pessoas; desta forma, quando somadas todas essas perdas, elas são superiores aos custos necessários ao controle da doença.

A prevalência da brucelose em propriedades destinadas à produção de leite

(10,97%) é superior à prevalência em propriedades destinadas a bovinos de corte (9,37%) em regiões do Triângulo Mineiro, conforme estudos de Gonçalves et al. (2009). A exploração de animais de condição sanitária desconhecida coloca em risco não apenas quem trabalha nessa atividade mas também quem consome produtos oriundos desses animais. No caso específico da brucelose, caso o leite não seja pasteurizado ou receba algum tipo de tratamento térmico eficiente, é um possível meio de transmissão para consumidores.

Muitos consumidores preocupam-se pouco com a origem do leite e dos queijos que consomem, valorizando no caso do leite fluido o fato de vir direto da fazenda, sem passar por processos de pasteurização, fato que pode agravar o risco de transmissão de doenças (MIYASHIRO, 2004).

Antes do advento da pasteurização, a principal forma de contágio da brucelose para o homem era por meio da ingestão de leite e derivados oriundos de vacas e cabras infectadas (NICOLETTI, 2002; PAPPAS et al., 2005). Com a utilização da pasteurização, as principais formas de transmissão passaram a ser devido ao contato direto com animais infectados e aerossóis (ACHA; SZYFRES, 2003).

1.5 Vacinas contra brucelose bovina

A vacinação é uma das estratégias mais importantes na estrutura de um programa de controle de uma doença como a brucelose, constituindo um fator primordial para baixar a prevalência em países em desenvolvimento, devido ao baixo custo envolvido (LAGE et al., 2008).

A vacina ideal para brucelose deveria ser inócua para homens e animais, proteger 100% dos animais com dose única, não possuir restrições quanto ao sexo e à faixa etária, ser de baixo custo, fácil armazenagem e transporte e não interferir no diagnóstico da doença (PAULIM; FERREIRA NETO, 2003). Porém ainda não é possível reunir todas essas características em uma mesma vacina, sendo necessário optar por características relacionadas a melhores níveis de proteção.

As vacinas vivas são as únicas que têm a capacidade de promover a multiplicação do agente no organismo do hospedeiro, sendo essa multiplicação fundamental para a elaboração de uma resposta imune mediada por células, que

tem papel essencial para eliminar a *Brucella* e proteger o hospedeiro de uma nova infecção (NICOLETTI, 1980).

A proteção proporcionada pelas vacinas atenuadas se deve à capacidade dessas em induzir a produção de linfócitos T de memória, que sensibilizados, circulam pela corrente sanguínea até encontrarem bactérias livres ou mesmo internalizadas em macrófagos. A concentração associada à multiplicação local desses linfócitos leva à produção de substâncias solúveis, que recrutam e ativam macrófagos e outros tipos de linfócitos com a finalidade de destruir as bactérias (JONES; HOOPER, 1976).

A principal vacina utilizada em muitos países, inclusive no Brasil, é denominada B19 devido à forma como foi descoberta. A vacina foi elaborada a partir de um isolado atenuado de *Brucella abortus* em 1923 por Jonh Buck a partir de uma amostra de leite de uma vaca Jersey que, embora não tivesse abortado, havia se tornado estéril. O pesquisador percebeu que a amostra conferia proteção contra o aborto e contra a infecção quando aplicada em fêmeas sexualmente imaturas, sendo capaz de conferir uma imunidade duradoura e estável (ADAMS, 1990).

A cepa da vacina B19 não se beneficia da degradação do eritritol, devido à ausência de um fragmento de 702 pares de base do gene Ery (CORBEL, 1997). A falta da enzima D eritrose-1-fosfato desidrogenase causa o acúmulo de um metabolito intermediário tóxico, e a depleção nos níveis de ATP, provocando inclusive a inibição de seu crescimento na presença do eritritol (ADAMS, 1990).

A vacina B19 apresenta como inconveniente a presença da cadeia “O”, que induz a produção de anticorpos aglutinantes nos primeiros meses de pós-vacinação, e pode interferir em testes de diagnóstico. A B19 é patogênica para outras espécies, inclusive o homem, assim como para bovinos machos, que permanecem com títulos vacinais por toda vida (OMS, 1986).

A vacina RB 51 (*Rough Brucella* 51) foi obtida a partir de repiques sucessivos de uma amostra virulenta de *B. abortus* 2308 em meios contendo rifampicina, de forma a se obter uma cepa mutante rugosa, resistente à rifampicina, mas estável e atenuada (SCHURING et al., 1991).

A ausência do gene *wboA* na cepa vacinal da RB 51, responsável pela codificação de uma glicosiltransferase, e essencial para biossíntese do antígeno da cadeia “O” do LPS, permite que a vacina seja utilizada na imunização de fêmeas

adultas, pois não induz a produção de anticorpos aglutinantes (VEMULAPALLI et al., 2000).

Não é conhecido ainda qual o tempo que uma única dose da vacina RB 51 é capaz de conferir proteção ao animal vacinado, nem se realmente representa algum tipo de risco aos seres humanos, haja vista que é excretada no leite de animais adultos vacinados. A excreção de RB 51 pelo leite de vacas vacinadas já foi comprovada, mas a intensidade e duração dessa excreção ainda não está totalmente esclarecida (LEAL-HERNANDEZ et al., 2005).

No Brasil, a vacina RB 51 é utilizada de forma complementar, haja vista que a vacinação com a B19 ainda é obrigatória no país, com exceção do Estado de Santa Catarina. A comercialização e utilização da vacina RB 51 foi regulamentada pela instrução normativa nº 33, de agosto de 2007, que estabelece em quais situações a vacina deve ser utilizada (BRASIL, 2007).

1.6 Controle da brucelose bovina

Segundo Paulin e Ferreira Neto (2003),c um programa de controle da brucelose bovina deve se estruturado em quatro fases:

- Deve-se iniciar por uma elevada cobertura vacinal, com taxas superiores a 80%, o que levaria a decréscimo da prevalência com valores inferiores a 2%.
- A segunda fase é marcada pelo abandono da vacinação e incremento das ações de diagnóstico e sacrifício sistemático dos animais soropositivos, pois depois de atingida a taxa de prevalência abaixo de 2%, a vacinação torna-se desnecessária. Devendo- se substituir as estratégias de controle pelas de erradicação, objetivando-se não mais apenas reduzir o número de focos, mas sim eliminá-los. Em um programa de erradicação, as estratégias empregadas têm como objetivo a detecção dos focos residuais, utilizando-se para isso as pesquisas de anticorpos no leite, estudos por amostragem, investigações de casos de brucelose humana, investigação epidemiológica de propriedades relacionadas a propriedades-foco e investigação de abortos em bovinos.

- A terceira fase deve ser a solução de problemas individuais, levando ao aprimoramento do programa a cada região.
- A quarta fase consiste no conjunto de ações de vigilância para que se evite o retorno da infecção, e rápida detecção e eliminação caso seja novamente detectada a presença da doença.

Sistemas de vigilância eficientes necessitam de integração em diversos setores de saúde pública, de forma a se estabelecer um fluxo de informações entre o serviço de inspeção em abatedouros e o serviço de defesa sanitária animal (BRASIL, 2006).

Os programas bem estruturados atingem bons níveis de controle com redução de prevalência após aproximadamente 20 anos de trabalho. Constituindo-se de programas com intensa coordenação entre ações do serviço oficial e entidades privadas, que resultam não apenas na eliminação da doença mas também no desenvolvimento e fortalecimento dos serviços de defesa sanitária animal (BRASIL, 2006).

As espécies silvestres com destaque para as unguladas são reservatórios naturais da *Brucella abortus* e desempenham um importante papel na epidemiologia da doença, atuando como mantenedores do agente no ambiente silvestre (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Essas espécies estão relacionadas ao reaparecimento de focos em regiões consideradas livres de brucelose, demonstrando que a manutenção do status de livre é dependente de vários fatores.

1.7 Diagnóstico da brucelose

Segundo Bricker (2002), o diagnóstico definitivo de uma doença é obtido pelo isolamento e identificação do agente envolvido, porém os métodos diretos se tornam inviáveis quando se trabalha com rebanhos e com agentes de elevado risco de manipulação, como são bactérias do gênero *Brucella*.

A brucelose é a mais frequente infecção bacteriana adquirida em laboratório, o que comprova o elevado risco de isolamento desse agente. No homem provoca sinais inespecíficos, afetando vários órgãos e sendo altamente incapacitante, o que eleva os custos indiretos da doença (DAHOUK et al., 2003).

O diagnóstico indireto é o mais adotado e envolve a pesquisa de anticorpos *anti-Brucella* em soro ou líquidos orgânicos, como sêmen ou muco vaginal. Já o

método direto, menos utilizado, ocorre por meio do isolamento da *Brucella* de líquidos ou tecidos, sendo mais restrito a pesquisas (VANZINI, 1995; POESTER, 1997).

Para Mathias (1996), em programas de controle da brucelose bovina o mais indicado para reduzir falhas decorrentes de testes de diagnóstico seria utilizar uma combinação de provas sorológicas que se completem e associá-las à análise epidemiológica do rebanho examinado.

Segundo Langenegger (1992), é difícil conciliar em uma mesma prova alta sensibilidade e especificidade. Cada teste apresenta vantagens e limitações, fatores inerentes ao próprio teste, que certamente devem ser levados em consideração na escolha do teste de diagnóstico a ser aplicado no rebanho.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) foi instituído em janeiro de 2001, tendo como objetivos baixar a prevalência e a incidência da brucelose e da tuberculose e criar um número significativo de propriedades certificadas como livres dessas doenças, visando oferecer ao consumidor produtos de baixo risco para a saúde pública (BRASIL, 2001).

O PNCEBT determina os métodos de diagnóstico para brucelose e os tipos de teste aos quais cada rebanho deve ser submetido, além de classificá-los como testes de triagem ou testes confirmatórios, como especificado a seguir:

- I. Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT): trata-se de um teste de triagem muito sensível, de fácil execução, realizado por médicos veterinários credenciados;
- II. Teste do 2-mercaptoetanol: teste confirmatório é mais específico, devendo ser executada em laboratórios credenciados ou em laboratórios oficiais credenciados.
- III. Teste de fixação de complemento: deve ser executado por laboratórios oficiais, para efeitos de trânsito internacional e para o diagnóstico de casos inconclusivos ao teste do 2-mercaptoetanol;
- IV. Teste do anel em leite: deve ser utilizado para monitoramento da condição sanitária de propriedades certificadas e como ferramenta em vigilância epidemiológica para brucelose (BRASIL, 2003).

A prova do AAT, denominada comumente como teste do rosa bengala, consiste em uma soroaglutinação em placa, com o antígeno tamponado em pH baixo (3,65). Este procedimento promove a acidificação do antígeno, reduzindo a atividade da IgM e tornando a prova seletiva para identificação da subclasse IgG1 (MEGID et al., 2000).

Em outubro de 2010, através da Instrução Normativa número 27, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento aprovou o teste de polarização fluorescente – TPF como método oficial para ser utilizado no diagnóstico de Brucelose (BRASIL 2010)

O teste de 2-ME tem como base a ação de certos compostos redutores que contêm o radical tiol (2-ME), que atua degradando a conformação pentâmera da IgM e consequentemente determinando a perda da atividade aglutinante. Esta desnaturação torna a prova sensível às aglutinações estabelecidas pela classe IgG, que não sofre alterações de conformação devido a presença do 2-mercaptoetanol (MEGID et al., 2000).

Segundo Bercovitch (1998), o teste de 2-mercaptoetanol deve ser realizado em conjunto com a soroaglutinação lenta em tubos, tendo em vista que o 2-mercaptoetanol não detecta as frações IgM, não sendo adequado para infecções recentes, podendo resultar em falso negativo.

Os métodos sorológicos convencionais apresentam o inconveniente relacionado à incapacidade de diferenciar animais vacinados com cepa B19, de animais infectados naturalmente com a cepa de campo. A busca por novas técnicas e ou aprimoramento de técnicas existentes, visando superar os inconvenientes das provas convencionais, têm sido um dos grandes desafios das pesquisas (SAMARTINO et al., 2000).

O teste ELISA é uma reação que tem com base o uso de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, na qual o complexo resultante possui atividade imunológica e enzimática. Devido à ligação de um de seus componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e associados a um suporte imunoabsorvente, o complexo formado torna-se imobilizado. A adição de um substrato com características cromogênicas específico para a enzima promove o desenvolvimento de coloração que pode ser mensurada com o auxílio de um fotocolorímetro ou de um espectrofotômetro. Dentre os diversos ELISAs, o indireto (ID) é amplamente utilizado para a detecção ou quantificação (titulação) de

anticorpos em amostras de soro, especialmente em estudos soropidemiológicos (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucelosis. In: ACHA, P.N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica N°580, p. , 2003.
- ADAMS, L.G. Development of lives Brucella vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press. Colleges Station, 1990. p. 251-276.
- ALTON, G.G.; JONES, M.L.; PIETZ, D.E. **Las técnicas de laboratorio en brucelosis**. Genebra: WHO, 1976. 175p.
- ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI, S. C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, O. G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinaria México**, México. v. 32, n. 2, p. 131-139, abr./jun. 2001. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2001/vm012f.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2014.
- BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 367-382, dez. 2002.
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, microplasmose**. São Paulo: Roca, 1988. p. 144-160.
- BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. 380p.
- BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Veterinary Quarterly**, v.20, n.3, p.81-88, 1998.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**. Austin:Texas: A&M University Press, College Station,1994. p. 1053-1066.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 27**, Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA Nº 33**, Brasília, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**, Brasília, 2006.184p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): versão preliminar**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT: legislação**, Brasília, 2001. 47p.

BRICKER, B.J. PCR as diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-436, dec. 2002.

CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, 2003. 20p.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia, London: Lea and Febiger, 1991. 290p.

CARVALHO-NETA, A.V.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE A.P.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p.146–155, mai.2010.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. In INTERNACIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., Jerusalem. **Proceedings...** 1997 , v. 3, n. 2, p. 213-221.

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

CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. Brucellosis – new aspect of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p. 1270-1281, 2005.

DAHOUK, S.A.; TOMASO, H.; NOCKER, K.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory based diagnosis of brucellosis: A review of the literature. **Clinical Laboratory**, v.49, n.11-12, p. 487-505, 2003.

DIAS, R. A. **Caracterização espacial da brucelose bovina no Estado de São Paulo**. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DIVERS, T. J; PEEK, S. F. **Rebhun's Diseases of Dairy Cattle**. Missouri: Saunders Elsevier, 2 ed, 2008. 686p

ENGLAND, T.; KELLY, L.; JONES, R.D.; MACMILLAN, A.; WOOLDRIDGE, M. A simulations model of brucellosis spread in British cattle under several testing regimes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1-2, p. 63-73, abr. 2004.

FERREIRA- NETO, J.S. **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções.** Universidade de São Paulo – USP. Comitê Científico Consultivo do PNCEBT- MAPA, 2009.

GARCIA-CARRILLO, C. Pruebas suplementarias para el diagnostico de la brucelosis. Nota Tec. **Centro Panamamericano Zoonozes.** n.25, p.5-19, 1982.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARDIN-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 Reserch**, v. 36,n. 3, p. 313-126, mai./jun.2005.

GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J. J.; TIBOR, A.; MCMILLAN, A.; SPENCER, S.; SANNA, M.; BAKKE,R D.; POUILLOT, R.; GARIN-BASTUJI, B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 461-477, dez.2002.

GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C.; DIASR. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO, T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 35-34, nov. 2009.

HERRERA-LOPEZ, E.; SUÁREZ-GÜEMES F.; HERNÁNDEZ- ANDRADE, L.; CÓRDOVA-LÓPEZ, D.; DÍAZ-APARICIO, E. Epidemiological study of brucellosis in cattle, immunized with *Brucella abortus* RB51 vaccine in endemic zones. **Vaccine**, v.28, n.1,p. 59 - 63, oct. 2010.

JONES, F.M.; HOOPER, J.A. *Brucella abortus* strain 19 calfhood vaccination a review. **The Southwestern Veterinarians**, v. 29.p. 219-225.1976.

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**, v. 32, n.3, p. 202-212, jul./set.2008.

LANGENEGGER, J. Brucelose. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. **Doenças dos bovinos de leite adultos.** Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1992. p. 83-96.

LEAL-HERNANDEZ, M.; DIAZ-APARICIO, E.; PÉREZ, R.; HERNÁNDEZ ANDRADE, L.; ARELLANO- REYNOSO, B.; ALFONSECA, E.; SUÁREZ-GUEMES, F. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced In a herd with active Brucellosis, with presence of atypical humoral response. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n.1, p-63-70, jan.2005.

LOPES, L.B.; NICOLINI, R.; HADDAD, J.P.A. Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review. **The Open Veterinary Science Journal**,v.4,n.1, p.72-84. 2010.

- LORD, V.R.; SCHURIG, G.G.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELENDEZ, G.E., Field Study os Vaccination of Cattle With Brucella abortus Strains RB 51 and 19 Under High and Low Disease Prevalence. **American Journal Veterinary Research**, v. 59 n. 8, p.1016-1020.ago.1998
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.360p.
- MARIANELLI, C.; GRAZIANI, C.; SANTANGELO, C.; XIBILIA, M. T.; AMATO, R. NERI, D.; CUCCIA, M.; RINNONE, S.; DI MARCO, V.; CIUCHINI, F. Molecularepidem iological and antibiotic susceptibility characterization of brucella isolates from humans in Sicily, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2923-2928, set. 2007.
- MATHIAS, L. A. Diagnóstico laboratorial da brucelose. In: ENCONTRO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIOS DO CONESUL. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. p. 139-140.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.5, p.00-00, ago.2000.
- MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de Brucella abortus em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- NICOLETTI, P.A. Short history of brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p.5-9, dez. 2002.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veerinary Science & Comparative Medicine**, v.24,n.1 p. 69-98. 1980.
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 447-459. dez. 2002.
- OIE. Office International des Epizzotie. **List of Foot and Mouth Disease-free countries**. International animal health code. Paris: OIE, 2001. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/info/en_fmd.htm > Acesso em: 16 jul. 2014.
- Organización Mundial de la Salud. **Comité Mixto FSO/OMS de expertos en brucelosis**. Ginebra, 1986, 149 p.
- PAPPAS, G AKRITIDIS, N.; BOSILKOVISKI, M.; TSIANOS, E. Medical progress: Brucellosis (Review article) **New England Jounal of Medicine**, v .352, n. 22, p. 2325-2336, 2005.
- PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: Situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154p.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose: revisão sistematizada. **Medicina Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, jun.2003.

POESTER, F.P., Vacinas Contra a Brucelose Bovina: Situação Atual e Perspectivas. **Centro de Pesquisa Veterinária “Desidério Finamor”**. Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo, v.60, n.2, p. 3-7jul./dez.1998
POESTER, F.P. **Vacinas contra brucelose: Passado, presente e futuro**. In: 50th Anniversari Meeting of Brucellosis Research Conference. p.8-9, 1997.

RAMOS, T.R.R.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; SOBRINHO, P.A.M.; SANTANA, V.L.A.; GUERRA, N.R.; MELO, L.E.H.; MOTA, R.A. Epidemiological aspects of on infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the Microrregion of Araguaína, Tocantins. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, v.12, n. 2, p.133-138, abr.2008.

SALDARRIAGA, O.A.; OSSA, J.E.; RUGELES, M.T. Respuesta immune y estatégias de evasion durante la infeccion com *Brucella spp*. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v.15, n.2, p. 180-187, mai.2002.

SAMARTINO, L.; BUFFONI, L.; CONDE, S.; GREGORET, R. Nuevas metodologias para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. **Revista de Medicina Veterinária**, v.82, n. 2, p. 90-94. 2000.

SÁNCHEZ, J.B.; HERNANDÉZ, F.I.S.; APARÍCIO, E.D.; CAÑAS, C.M.; GONZÁLEZ, R.P.; ANDRADE, L.H. Estudio Bacteriológico y Serológico de Brucelosis en Vacas Revacunadas com Dosis Reducida de Cepa 19 de *Brucella abortus*. **Técnica Pecuária em México**, v. 38, n. 1, p. 35-42, 2000.

SCHURING, G.G.; ROOP, R.M.I.; BAGCHI,T.;BOYLE,S.;BUHRMAN, D.;SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB15; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, p. 171-188, 1991.

SELENN, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 392-398, jan. 2010.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J. E. The genus *Brucella*. In: TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. (Ed.). **Hagan and bruner’s microbiology and infections diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates, 1988, p. 135-152.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 609p.

VANZINI, V. Las pruebas sorológicas utilizadas para el control de la brucelosis bovina In: INTA. **Estrategias para el control de la brucelosis de lós bovinos com énfasis em estabelecimentos com alta prevalencia**. Estação experimental de agropecuária Rafaela. INTA, out. 1995. 20p.

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CORTES, J.A. **Bases para a prevenção da brucelose animal.** Comunicado Científico. Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo. v.11, n. 1, p. 25-36, 1987.

VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCCOLO, L.S.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURING, G.G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in o-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. **Infection na Immunity**, v. 68, n.7, p. 3927-3932, jul.2000.

CAPÍTULO 2 - CORRELAÇÃO ENTRE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E TESTE DE ANEL EM LEITE PARA DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE

RESUMO

A brucelose é uma doença infecciosa altamente transmissível e potencialmente zoonótica que ocorre de forma endêmica no Brasil. O teste de anel em leite (TAL) é um teste e diagnóstico para brucelose aprovado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Alguns fatores podem interferir no seu resultado, como a fase de lactação, mastites e o leite ácido. A contagem de células somáticas (CCS) é um dos principais parâmetros para avaliar a saúde da glândula mamária, e consequentemente a presença de processos inflamatórios. Desta forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar a existência de correlação entre altas contagens de células somáticas e reações positivas no TAL. Foram analisadas 181 amostras de leite oriundas de tanques de expansão, provenientes de diferentes propriedades, por meio do TAL e realizada a (CCS) através do método de citometria de fluxo. O TAL indicou 11 amostras positivas, das quais, 5 (45% das amostras positivas), encontravam-se na faixa de 6×10^5 cel/mL. Os resultados das análises demonstraram não haver associação estatística entre altas contagens de células somáticas e reações positivas no teste de anel em leite.

PALAVRAS-CHAVE: Brucelose. Teste anel em leite. Células somáticas

CHAPTER 2 - CORRELATION BETWEEN SOMATIC CELL COUNT AND MILK RING TEST FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious highly transmissible and potentially zoonotic disease that occurs endemically in Brazil. The diagnosis is based primarily on the detection of antibodies in serum but other fluids such as milk may also be used. The milk ring test (MRT) is approved by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, but has some factors that can interfere with the outcome as the stage of lactation, mastitis, and acid milk. The somatic cell count is one of the key parameters to assess the health of the mammary gland, and consequently the presence of inflammatory processes. The objective of this research was to evaluate the correlation between high somatic cell counts and positive reactions in the MRT. The results of the analysis showed no association between high somatic cell counts and positive reactions in the milk ring test.

KEYWORDS: Brucellosis, milk ring test, somatic cells

2.1 Introdução

A brucelose bovina é uma doença infecciosa de origem bacteriana, que possui como agente causador predominante a *Brucella abortus*, sendo responsável por abortos nos estágios finais da gestação, assim como altas taxas de infertilidade (ALTON; JONES; PIETZ, 1976). A doença apresenta-se como uma enfermidade de evolução crônica, caráter infeccioso, altamente transmissível e com alto potencial zoonótico, acometendo preferencialmente fêmeas em idade de reprodução e eventualmente machos (CAMPANÃ; GOTARDO; ISHIZUCA, 2003).

No Brasil a brucelose ocorre de forma endêmica, sendo responsável por graves perdas econômicas, porém o real impacto financeiro é difícil de ser estimado. Embora nos programas de controle e erradicação as notificações de casos positivos às autoridades de saúde animal sejam obrigatórias, os números oficiais podem representar apenas frações da verdadeira ocorrência da enfermidade (SELEN; BOYLEI; SRIRANGANATHAN, 2010).

O diagnóstico indireto é o mais adotado e envolve a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* em soro ou líquidos orgânicos. O método direto, menos utilizado, é realizado por meio do isolamento e identificação da *Brucella* em líquidos ou tecidos, sendo mais restrito a pesquisas (BRASIL, 2006; NIELSEN, 1995).

De acordo com Brasil (2006), os métodos de diagnóstico baseados na pesquisa de anticorpos utilizam predominantemente soro, porém vários outros fluidos corporais podem ser utilizados, como o sêmen, o muco vaginal e o leite, nos quais a detecção de anticorpos específicos podem caracterizar a presença de brucelose.

O TAL tem a capacidade de revelar anticorpos da classe IgA, aderidos às moléculas de gordura pela sua fração Fc. Quando o anticorpo reage com o antígeno corado (hematoxilina ou tetrazólio) forma-se a malha de aglutinação, que se junta à gordura, sendo arrastados para superfície e revelando o anel colorido que identifica a amostra positiva (BRASIL, 2006).

A alta sensibilidade do teste do anel em leite (TAL) permite identificar rebanhos infectados e monitorar rebanhos livres (NIELSEN, 1995). Desta forma, o TAL pode ser considerado um método barato e eficaz para vigilância de brucelose em rebanhos leiteiros, e facilmente utilizado em plataformas de recepção de leite (BLOOD; RODOSTITS, 1991).

A mastite é definida como um processo inflamatório da glândula mamária em resposta a uma agressão química, física ou biológica (RADOSTITS et al., 2002). Cerca de 90% das mamites têm como agente patogênico bactérias. A forma clínica da mastite exibe sinais evidentes, sendo de fácil identificação pelas alterações nas características do leite, e normalmente observadas durante os testes realizados antes da ordenha. A forma subclínica não apresenta sinais passíveis de serem visualmente identificados, sendo diagnosticada por testes como o California Mastitis Test (CMT) (PHILPOT e NICKERSON 1991)

As células somáticas são o conjunto das células presentes no leite, composto por células epiteliais da glândula mamária e células com funções de defesa do organismo, como neutrófilos, linfócitos e macrófagos (ANDREWS et al., 2008; HARMON, 1994; SCHUKKEN et al., 2003;). Segundo Sordillho et al. (1997), os neutrófilos são as células predominantes no início da inflamação, e as células epiteliais representam apenas uma pequena percentagem.

A contagem de células somáticas (CCS) apresenta correlação positiva com a presença de mastite, constituindo um dos principais métodos do diagnóstico de infecção e monitoramento da saúde da glândula mamária. Elevações acima de 200.000 céls/mL são consideradas anormais e constituem um indicativo de inflamação do úbere, e esse valor pode chegar a milhões de céls./mL nos casos clínicos de mastite (HARMON, 2001).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a existência de correlação entre altos valores de CCS e reações positivas no TAL para o diagnóstico de brucelose.

2.2 Materiais e Métodos

A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo nº 019/14 (Anexo 1).

A pesquisa foi desenvolvida em parceria com uma empresa de laticínios, sendo coletadas 181 amostras de leite diretamente do tanque de expansão de cada propriedade. As amostras foram coletadas aleatoriamente em frascos estéreis de 70 mL, acondicionadas em recipientes isotérmicos, mantidas entre 2°C a 8°C e encaminhadas ao laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da

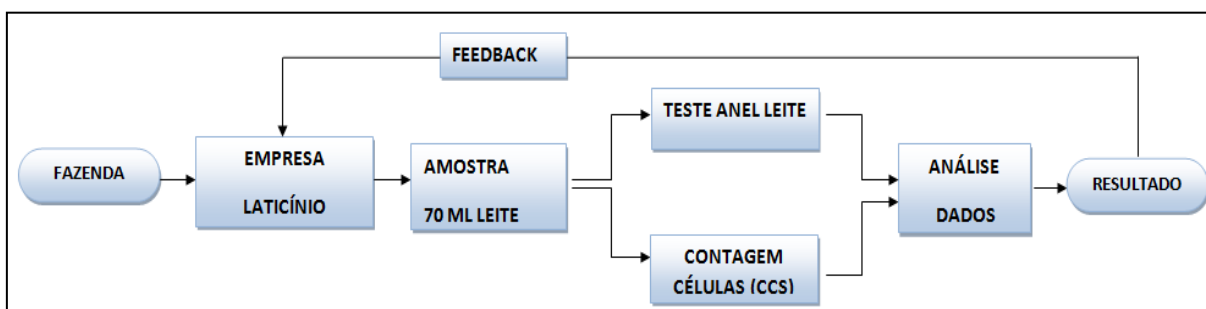
Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Para a realização das análises, cada amostra foi dividida em duas partes, conforme demonstrado na figura 2, sendo uma fração acondicionada em frascos com conservante bronopol® (2-bromo-2 nitropropano-1,3 diol) e encaminhada para o laboratório da Clínica do Leite no município de Piracicaba, São Paulo, (ESALQ/USP), para a contagem eletrônica de células somáticas por citometria de fluxo (IDF, 1995).

Outra fração de cada amostra foi destinada ao TAL, sendo adicionado 1mL de formol a 1% para cada 10 mL de leite e mantida refrigerada por 24 horas. Antes do teste as amostras foram homogeneizadas, e com o auxílio de uma pipeta, 1,0 mL de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio, em seguida adicionaram-se 30 µL do antígeno para a prova do anel do leite. O antígeno utilizado foi produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) partida 003/13 e fabricado em outubro de 2013. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora. A leitura foi realizada conforme recomendações da OIE (2009) e Gonzáles-Tomé (1993) onde a presença de um halo de cor azul sobre uma coluna branca é o indicativo de reação positiva.

Os resultados de CCS e do TAL foram analisados através do teste de correlação de Spearman, utilizando o Software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Figura 2 – Fluxograma de ações executadas durante a realização da pesquisa



2.3 Resultados e Discussão

Os resultados referentes à contagem de células somáticas e ao teste de anel em leite estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação entre a contagem de células somáticas (CCS) e resultado no teste de anel em leite (TAL) para brucelose em 181 amostras coletivas de leite

Resultados no TAL					
CCS (10 ³ /mL)	Nº de Reagentes	(%)	Nº de Não Reagentes	(%)	Total
Até 300	02	4,7	40	95,3	42
301 a 600	05	7,5	61	92,5	66
601 a 900	02	4,7	40	95,3	42
901 a 1.200	00	0,0	12	100	12
Acima 1.201	02	10,5	17	89,5	19

A faixa de CCS com maior proporção de amostras reagentes ao TAL (5), encontradas neste estudo situou-se entre 301 e 600 x 10³, cel/ mL. Esses valores estão bem próximo de 500 x 10³, cel/ mL admitido como padrão para o leite cru pela IN 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011).

Segundo Brasil (2006), um dos fatores limitantes do TAL é a possibilidade de resultados falso-positivos em presença de leite proveniente de animais com mastite.

Mesmo amostras com alta contagem de células somáticas, como as que apresentaram valores superiores a 1,5 x 10⁶ /mL, não foram reagentes ao teste de anel em leite, demonstrando que processos inflamatórios com altas contagens de células somáticas não foram suficientes para deflagrar resultados positivos.

Os resultados encontrados nesta pesquisa divergem dos resultados encontrados por Silva-Junior et al. (2007), que obtiveram elevado percentual de reações falso-positivas no TAL em animais que apresentaram reação positiva ao teste de CMT. Segundo Chielle et al. (1989), a causa mais provável de resultados falso-positivos no TAL seria a presença de leucócitos e células de descamação da glândula mamária no leite, fato que não foi observado nesta pesquisa nas amostras com alta CCS. A diferença nos resultados pode estar relacionada à utilização de diferentes técnicas de mensuração de CCS, uma vez que neste estudo optou-se pela citometria de fluxo.

Devido à correlação existente entre a alta contagem de células somáticas e a ocorrência de mastites (HARMON, 2001), esperava-se que rebanhos com alto número de células somáticas também apresentassem maiores proporções de amostras reagentes no TAL, entretanto não foram encontradas associações

estatisticamente significativas entre o número de células somáticas e o resultado positivo no teste de anel em leite ($r= 0,0204$, $p= 0,7856$).

Reações falso-positivas nos testes sorológicos de diagnóstico de brucelose podem ser desencadeadas por anticorpos não específicos produzidos contra a cadeia “O” do fragmento LPS e presentes nas infecções por outras bactérias como *Escherichia coli* O:157, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* O:30, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas maltophilia* e *Vibrio cholera* O:1 (AL DAHOUK et al., 2006; GODFROID et al., 2002; KITTELBERGER et al., 1998; MOLNÁR et al., 1997; NIELSEN et al., 2004)

Resultados falso-positivos em testes sorológicos para diagnosticar a brucelose também foram relatados por Naves et al. (2012), devido à presença de anticorpos anti-*Leptospira* produzidos a partir de vacinas contra leptospirose.

Acredita-se que os resultados positivos dos testes de anel em leite proveniente de animais com mastite não estejam associados apenas ao aumento na quantidade de células somáticas, ou com processos inflamatórios inespecíficos na glândula mamária, mas sim relacionados ao tipo de bactéria envolvida no processo infeccioso que desencadeou a reação inflamatória, haja vista a capacidade de bactérias que apresentem a cadeia “O” do fragmento LPS interferir nos resultados de testes de diagnóstico de brucelose.

O TAL demonstrou-se eficiente na detecção de anticorpos anti-*Brucella*, não sofrendo interferência mesmo em altas contagens de células somáticas, reafirmando-se como importante ferramenta para vigilância epidemiológica de amostras de leite provenientes de tanques de expansão.

As amostras de leite reagentes nesta pesquisa (6%) apresentaram anticorpos anti-*Brucella abortus*, indicando a existência de animais brucélicos em lactação nestes rebanhos, fato que deve ser levado em consideração pelas autoridades sanitárias e usinas de beneficiamento de leite.

2.4 Conclusão

Verificou-se que altas contagens de células somáticas não estão diretamente ligadas a reações positivas no teste de anel em leite. Acredita-se que reações falso-positivas no teste de anel em leite proveniente de vacas com mastite estejam

relacionadas com reações cruzadas entre bactérias responsáveis pelo processo infeccioso e não simplesmente devido à resposta inflamatória da glândula mamária.

REFERÊNCIAS

- ALTON, G.G.; JONES, M.L.; PIETZ, D.E. **Las técnicas de laboratorio en brucelosis**. Genebra: WHO, 1976. 175p.
- AL DAHOUK, S.; NÖCKLER, K.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H.; BOGUMIL, C.; NEUBAUER, H. Immuno-proteomic characterization of *Brucella abortus* 119-3 preparations used for serodiagnosis os *Brucella* infections. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, n.1,p. 34-47, feb. 2006.
- ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDE, R.G. **Medicina Bovina: Doenças e Criação de Bovinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080p.
- AYRES, M.; AYRES, J.R M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Versão 5.0. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. 324 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62**, Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**, Brasília, 2006.184p.
- BLOOD, D. C. ; RODOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. p.570- 579.
- CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M.**Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, 2003. 20p.
- CHIELLE, L.L.; WEIBLEN, B.; MOREIRA, W. S.; FLÔRES, M.L. Especificidade da prova do anel de leite (PAL) para o diagnóstico da brucelose bovina na bacia leiteira do município de Santa Maria – RS, Brasil. **Revista do Centro Ciências Rurais**, v.19, n.4, p.351-358, nov. 1989.
- GODFROID, J.; SAEGERMAN, C.; WELLEMANS, V.; WALRAVENS, K.; LETESSON, J. J.; TIBOR, A.; MCMILLAN, A.; SPENCER, S.; SANNA, M.; BAKKE,R D.; POUILLOT, R.; GARIN-BASTUJI, B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when specific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. **Veterinary Microbiology**, v. 90,v.1-4, p. 461-477, dez.2002.
- GONZÁLES TOMÉ, J.S. **Curso de brucelosis animal**. Goiânia: Organização Mundial de Saúde, jun. 1993. 63p.
- HARMON, R.J. Somatic Cell Counts: A Primer. National Mastitis Council 40th, Annual Meeting **Proceedings**..., pp. 3-9, 2001.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, jul.1994.

IDF - International Dairy Federation, Milk. **Enumeration of somatic cells**. IDF Standard 148A, Brussels: 1995, 8p.

KITTELBERGER, R.; BUNDESEN, P. G.; CLOECKAERT, A.; GREISER-WILKE, I.; LETESSON, J. J. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C-epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 60,n.1, p. 45–57, fev. 1998.

MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; TURY, E.; SOUSA, J. S. Concepções modernas para o diagnostico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n.4, p. 157–162, 1997.

NAVES, J.H. F. F.; REZENDE, L. M, RAMOS, G. C.; SOARES, P.M.; TAVARES, T.C.F.; FRANÇA, A.M.S.; NEVES, S.M.N.; SILVA, N.A.M.;LIMA- RIBEIRO, A.M.C. Interference in Diagnostic Tests for Brucellosis in Cattle Recently Vaccinated Against Leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.2, p. 283-28, mar.2012.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v.100, n. 1-2, p .25–30, mai.2004.

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

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine Brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code**. 2009.

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

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A.P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de

prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.61, supl.1, p.1-5, nov.2009.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.;HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1770p.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY L.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, set./out. 2003.

SELENN, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 392-398, jan. 2010.

SILVA-JUNIOR, F.F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.59, n.2, p.295-300, abr.2007.

SORDILLO LM, SHAFER-WEAVER K, ROSA D. Immunobiology of mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p. 1851-1865, ago.1997.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de um kit de teste imunoenzimático indireto (ELISA) para diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite. Para comparação entre os resultados foi utilizado o teste de anel em leite (TAL), por ser o único teste oficial para amostras coletivas em leite do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Foram coletadas 181 amostras de leite *in natura* de tanques de expansão de rebanhos do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e encaminhadas ao laboratório onde as amostras foram divididas em 2 frações. Uma das frações foi destinada ao teste do anel em leite (TAL) e a outra fração destinada ao ELISA. O teste ELISA identificou 42 amostras positivas, 11 suspeitas e 128 negativas. O ELISA apresentou sensibilidade de 72,8%, especificidade de 78,7% e um índice de concordância Kappa de 0,22. Posteriormente, 9 rebanhos foram selecionados para realização de testes individuais de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol 2(ME), por meio de amostragem aleatória dos animais em lactação. Apenas em rebanhos considerados positivos no TAL e no ELISA simultaneamente, foram encontrados animais reagentes aos testes sorológicos individuais. O teste ELISA apresentou valores de sensibilidade e especificidade inferiores aos relatados em outros países onde o teste ELISA já é utilizado, assim como a pesquisa confirmou a existência de focos de brucelose em rebanhos leiteiros.

Palavras-chaves: ELISA. Leite. *Brucella*.

CHAPTER 3 - EVALUATION OF THE INDIRECT ELISA TEST FOR DIAGNOSING BRUCELLOSIS IN COLLECTIVE MILK SAMPLES

ABSTRACT

We evaluated the performance of an indirect enzyme immunoassay kit (ELISA) for diagnosing brucellosis in collective milk samples. MRT is the only official test approved by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) and was therefore used for comparison. One hundred and eighty-one samples of fresh milk were collected from the expansion tanks of herds in the Triangulo Mineiro and Alta Paranaíba regions of Brazil. The samples were sent to a laboratory and divided into two groups. One group was tested by the milk ring test (MRT) and the other by ELISA. The ELISA test identified 42 samples as positive, 11 suspect and 128 negative. Elisa was 72.8% sensitive and 78.7% specific and had a Kappa concordance index of 0.22. Subsequently, random samples from lactating animals in nine herds were tested individually by the rose Bengal test (AAT) and the 2-mercaptoethanol 2(ME) tests. Animals testing positive to individual serological tests were only found in herds that were considered positive by both ELISA and MRT. The ELISA test was neither as sensitive nor as specific as reported in other countries where the ELISA test is used and where brucellosis outbreaks have been confirmed in dairy herds.

Keys word: ELISA. Milk. *Brucella*.

3.1 Introdução

A bovinocultura de leite é uma atividade econômica expressiva na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, porém ainda esbarra em problemas de ordem sanitária que têm impacto relevante na cadeia produtiva do leite.

As doenças infecciosas, entre elas a brucelose, são responsáveis por perdas elevadas de produção nos estabelecimentos pecuários. O controle da brucelose bovina é diretamente dependente da eficiência dos testes de diagnóstico para identificação e eliminação dos animais positivos (MOLNÁR et al., 2000).

A situação epidemiológica brasileira foi relatada em 2009, quando foram realizados estudos na maioria dos estados brasileiros. Em Minas Gerais, a prevalência de focos de brucelose foi estimada em 6,%. Porém, quando avaliada por regiões, a prevalência de focos no Triângulo Mineiro foi de 11%, superior à encontrada no restante das regiões do estado (GONÇALVES et. al., 2009).

A infecção por *Brucella* induz uma resposta de natureza humoral e celular, caracterizada pela formação de imunoglobulinas (Ig) que exercem suas atividades no soro e nas secreções animais (BUTLER e MAXWELL, 1972; SUTHERLAND, 1980).

Devido a sua característica intracelular, a proteção do organismo contra a infecção pelas bactérias do gênero *Brucella spp.* depende prioritariamente da resposta imune mediada por células, na qual neutrófilos, macrófagos, linfócitos T auxiliares e citotóxicos são fundamentais no combate a infecção (BRASIL, 2006).

A imunidade humoral é a responsável pelo desenvolvimento de anticorpos quando o organismo é desafiado por um antígeno. A principal característica desse tipo de imunidade é o fato de se produzir a memória imunológica, que será ativada em uma nova exposição com a finalidade de eliminar o patógeno. A imunidade humoral é classificada como natural, quando é desenvolvida a partir do contato direto com os agentes da enfermidade, ou artificial, quando seu desenvolvimento decorre de um estímulo vacinal (LANGONI, 2008 e BARRAL, 2005).

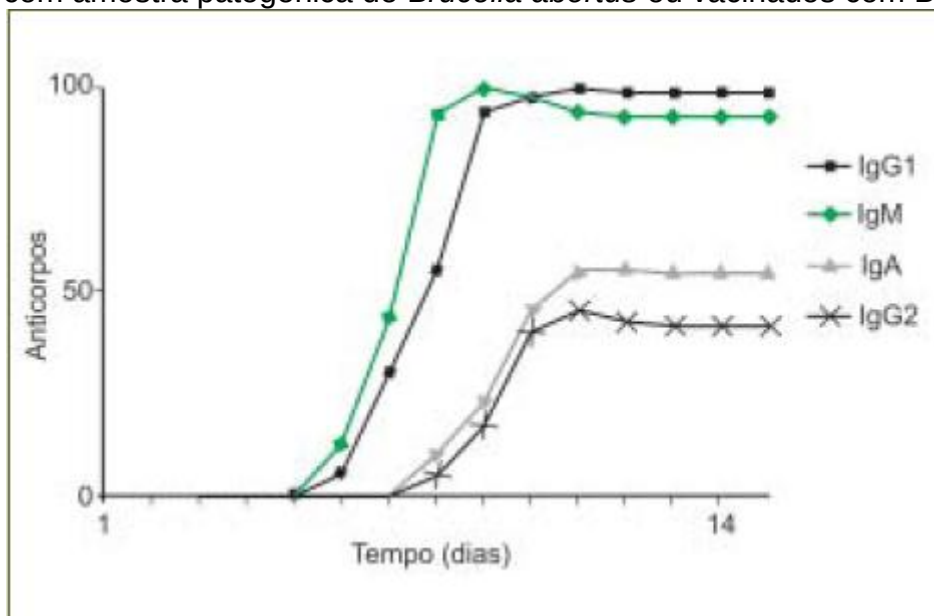
A resposta humoral de bovinos infectados por *B.abortus* ou vacinados com B 19 é caracterizada pela produção de quatro isotipos principais de imunoglobulinas: IgM, IgG1, IgG2 e IgA (BRASIL, 2006).

O estudo da dinâmica imunológica dos animais naturalmente infectados pela *Brucella* demonstra que ocorre o aparecimento quase simultâneo das duas classes

IgM e IgG, conforme exposto na figura 3. A evolução da doença promove declínio e tendência de desaparecimento da IgM, enquanto a IgG se estabelece e persiste. O desaparecimento da IgG está associado geralmente à eliminação da infecção. Em bovinos classificados como positivos para brucelose foi observado que a maioria das imunoglobulinas séricas pertencem à subclasse IgG1, com pequenas quantidades da classe IgM (MEGID et al., 2000).

Os animais infectados apresentam a mesma dinâmica de produção de anticorpos que os animais vacinados, iniciando com a produção de IgM, seguida da produção de IgG, com a diferença que nestes ela alcança títulos mais elevados e persistem por mais tempo, permanecendo na fase crônica da doença (SANGARI; AGUERO; GARCIA-LOBO, 1996).

Figura 3 – Resposta dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de *Brucella abortus* ou vacinados com B19



Fonte: Adaptado de Nielsen et al., (1996).

3.2 Testes de diagnóstico

Para o diagnóstico da brucelose, são utilizadas diversas provas sorológicas e todas possuem como objetivo identificar animais infectados. O sucesso de um teste de diagnóstico é dependente, em sua maior parte, de não se obter reações cruzadas, que representam resultados falso-positivos e de se conseguir reações

positivas com baixo título de anticorpos. Outras características desejáveis de um teste estão relacionadas ao baixo custo e à rápida aplicação (MOLNÁR et al., 2000).

No leite as imunoglobulinas predominantes são representadas pelas classes IgA, IgM e IgG1. O leite bovino possui menor quantidade de IgA quando comparado a demais espécies de animais domésticos. Apesar da reduzida quantidade de IgA solúvel no soro lácteo, essa quantidade pode ser até 16 vezes superior quando associado a gordura, devido à intensa associação que ocorre entre essa imunoglobulina e a membrana dos glóbulos de gordura do leite, assumindo grande importância na detecção de anticorpos em amostras de leite (SUTRA; CAFFIN; DUBRAY, 1986).

As reações positivas de cada tipo de teste sorológico estão relacionadas a determinada classe de anticorpos, conforme especificado por Molnár et al.(1997).

Tabela 2 – Provas sorológicas para brucelose associadas às classes de imunoglobulinas que detectam.

Provas sorológicas	Classes de Ig identificadas
Fixação de complemento	IgG1, IgM
Antígeno acidificado tamponado	IgG1, IgM
Soroaglutinação lenta	IgM, IgG2, IgG1
Inativação com 2-ME	IgG1, IgG2
ELISA	IgM, IgG1, IgG2
Prova do anel no leite	IgM, IgG1, IgA

Fonte: Adaptado de Molnár et al.(1997).

3.2.1 ELISA

Os anticorpos do tipo IgG1 são os prevalentes em animais naturalmente infectados, desta forma a detecção destes anticorpos constitui a base dos principais testes de sorodiagnóstico. Os testes de ELISA indireto, ELISA competitivo e de Fixação de complemento (FC) são os que apresentam maior sensibilidade, sendo capazes de detectar os limiares mais baixos para esta classe de anticorpos (WRIGHT; NIELSEN, 1990).

Os testes imunoenzimáticos indiretos (ELISA) para o diagnóstico da brucelose, apesar de ainda não serem testes oficiais do PNCEBT, já são utilizados

em países da Europa e apresentam características como alta sensibilidade e especificidade, que os tornam interessantes ferramentas para identificação de animais positivos para brucelose.

A prova de ELISA supera em sensibilidade e especificidade a maioria dos testes de diagnóstico sorológico e permite o processamento de um grande número de amostras, além de não sofrer interferência de hemólise (ESTEIN, 1999).

De acordo com Vanzini et al. (1998) e com Shafe et al. (2011), o ELISA indireto aplicado a amostras de leite apresenta uma sensibilidade superior a sensibilidade do TAL.

A alta sensibilidade que o teste ELISA apresenta permite detectar quase qualquer molécula imunorreativa. Diferentes formas de ELISA são empregadas para o diagnóstico de diversas enfermidades infecciosas (MATHIAS; MACMILLAN, 1995; SAMARTINO et al., 2000).

Os testes de ELISA possuem boa especificidade, com a vantagem de não estarem sujeitos ao fenômeno de zona como ocorre na RFC', porém são susceptíveis as limitações, como o alto investimento inicial, requerendo um laboratório equipado e mão de obra treinada para a sua execução (COLLING, 1998).

3.2.2 Testes sorológicos

Testes com elevada especificidade devem ser utilizados para elevar a margem de segurança do diagnóstico, principalmente em programas nos quais esteja prevista a eliminação dos acometidos pela doença. A utilização de testes em paralelo, além de elevar a sensibilidade, também pode evitar que reações cruzadas levem a sacrifícios desnecessários de animais.

3.2.3 Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2- Mercaptoetanol

Trata-se de testes oficiais do PNCEBT, no qual o AAT associa alta sensibilidade e fácil execução, sendo amplamente utilizado como teste de triagem. O 2-mercaptoetanol devido a alta especificidade, é utilizado como teste confirmatório em animais reagentes nos testes de triagem.

3.3 Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais – CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo 019/14 (anexo 1).

3.3.1 Local

A coleta das amostras coletivas de leite e individuais de sangue foi realizada em propriedades rurais do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, uma região que concentra grande quantidade de propriedades que possuem a bovinocultura de leite como uma das principais atividades econômicas.

3.3.2 Animais

A maior parte dos rebanhos que tiveram amostras de leite analisadas é formada por animais da raça Girolando, com diferentes graus de sangue. Outras raças com destaque são a holandesa, a Jersey e o pardo suíço.

3.3.3 Amostras de leite

Foram coletadas 181 amostras de leite *in natura*, provenientes de tanques de expansão em frascos estéreis de 70 mL. As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos, mantidas entre 2°C e 8°C, e encaminhadas ao laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU). Após a recepção no laboratório, as amostras foram homogeneizadas e divididas, sendo 10 mL mantido refrigerado a 4°C e destinados ao teste de anel em leite e a outra fração com 2 mL acondicionado em endorf e congelado a -80°C até o momento das análises.

3.3.4 Amostras de soro

A coleta de sangue dos animais que compunham os rebanhos dos quais foram coletadas amostras de leite, foi realizada por meio de venopunção asséptica da veia caudal, utilizando tubos com vácuo (Vacutainer®), sem anticoagulante, em animais

com idade superior a 24 meses que estivessem em período de lactação. As amostras de sangue foram transportadas até o laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi realizada a centrifugação a 3000 x g durante 5 minutos para a extração do soro. Cada amostra de soro foi identificada e posteriormente armazenada à temperatura de -20°C até o momento das análises.

3.3.5 ELISA

A pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* nas amostras coletivas de leite foi realizada por meio de um kit de ELISA indireto (*IDEXX® brucellosis Milk, IDEXX France*). Os procedimentos foram conduzidos conforme as recomendações do fabricante. Os reagentes foram homogeneizados por meio de movimentos de inversão suaves e estabilizados à temperatura entre 18°C e 26°C antes de serem utilizados. As placas utilizadas são compostas de poliestireno, com 96 poços e adsorvidas com LPS de *Brucella*. Em cada poço da foram adicionadas 200 μL de tampão de diluição.

Os controles positivos e negativos fornecidos no próprio kit foram reconstituídos previamente utilizando 1 mL de água destilada e adicionados 50 μL de controle positivo em 2 poços e a mesma quantidade de controle negativo em 2 poços, perfazendo um total de 4 cavidades para controle. As amostras foram estabilizadas à temperatura de 18°C a 22°C , homogeneizadas em aparelho vórtex, sendo pipetados 50 μL de cada amostra abaixo da camada de gordura e adicionado nos poços. Após homogeneização do conteúdo das cavidades, a placa foi protegida com cobertura adesiva para placas e incubada por 90 minutos à temperatura de 18°C a 22°C .

A lavagem das placas foi realizada em lavadora de microplacas ELISA (Thermoplate) por 5 vezes, com 300 μL de solução de lavagem por poço. Posteriormente foram adicionados 100 μL do conjugado previamente diluído (anti-IgG bovino com peroxidase), coberta e colocada em incubação por 30 minutos. Após o período de incubação procedeu-se novamente à lavagem da placa com 300 μL de solução de lavagem por 5 vezes, e adicionados 100 μL do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada cavidade, e incubada por 20 minutos em

temperatura entre 18⁰C a 26⁰C em ambiente escuro. A reação foi bloqueada com 100 µL de solução interrupção por cavidade, e a placa foi suavemente agitada.

A leitura da densidade óptica das reações foi realizada em espectrofotômetro de placas ThermoPlate, com filtro de 450 nm.

As amostras com densidade óptica que apresentaram relação amostra/controle positivo (A/CP) igual ou inferiore a 0,45 foram consideradas negativas, enquanto amostras com relação A/CP entre 0,45 e 0,55 foram consideradas suspeitas e amostras com a relação A/CP superior a 0,55 foram consideradas positivas para a presença de anticorpos contra *Brucella*, conforme recomendado pelo fabricante do kit.

A validação do ensaio é realizada analisando-se a DO dos controles, para o controle positivo a densidade óptica deve ser superior a 0,400 e a relação média entre o controle positivo e o controle negativo (CP/CN) deve ser superior a 3. Os resultados das absorbâncias foram avaliados pelo programa xCheck® 3.3 IDEXX Laboratories.

3.3.6 Calculo do Índice de Reatividade

O Índice de Reatividade (IR) foi calculado pela divisão dos valores de absorbância de cada amostra pelo valor do controle positivo (CP) de referência do dia.

3.3.7 AAT e 2 Mercaptoetanol

Com base nos resultados obtidos nos testes de ELISA e TAL, dez rebanhos foram selecionados para coleta de sangue destinado a realização de exames sorológicos individuais de AAT e 2-ME, conforme preconizados pelo MAPA para o diagnóstico da brucelose.

3.4.1 Antígenos

Os antígenos do TAL, AAT e 2-mercaptoetanol utilizados na pesquisa foram produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, licenciado pelo MAPA.

3.5 Análises Estatísticas

3.5.1 Amostragem de leite in natura em tanques de expansão

A quantidade de amostras de leite para realização do TAL e do ELISA foi estabelecida com base na disponibilidade de amostras fornecidas pelo laticínio sendo utilizadas no estudo 181 amostras.

3.5.2 Amostragem sorológica individual

A coleta de amostras de soro para realização dos exames individuais de AAT levou em consideração a capacidade operacional dos pesquisadores, o espaço de tempo disponível e a disponibilidade dos produtores em permitir a coleta de material dos rebanhos. Desta forma para a realização do teste sorológico de AAT foram selecionadas 10 propriedades de forma a se contemplar no mínimo 2 propriedades de cada resultado possível em ambos os testes, conforme exposto no Quadro1.

Quadro 1 – Esquema para coleta de amostra de sangue em bovinos submetidos ao teste de anel em leite e ao teste ELISA indireto para amostras coletivas de leite bovino

RESULTADO TAL	RESULTADO ELISA	QUANTIDADE DE REBANHOS
Positivo	Positivo	02
Positivo	Negativo	02
Negativo	Positivo	02
Negativo	Suspeito	02
Negativo	Negativo	02

Apesar de possível, o resultado Positivo no TAL e Suspeito no ELISA, não foi encontrado não sendo incluído no delineamento amostral.

Para a realização dos testes sorológicos confirmatórios, foi realizado um esquema de amostragem com a finalidade de identificar ao menos 1 animal positivo, caso a propriedade seja um foco de brucelose, com 95% de confiança. Para isso foi adotada a metodologia proposta por Gonçalves et al.(2009), na qual as propriedades que tivessem até 99 fêmeas com idade superior a 24 meses seriam escolhidos

aleatoriamente 10 animais para colheita de sangue, e nas propriedades com 100 ou mais fêmeas com idade superior a 24 meses, 15 animais.

O planejamento amostral foi idealizado para ser realizado em 10 rebanhos, porém como a pesquisa foi realizada em parceria com produtores, a coleta de amostras de sangue para os exames de AAT foi realizada em consenso com proprietários. Um dos proprietários, apesar de orientado sobre o objetivo da pesquisa, recusou-se a permitir a coleta de material para diagnóstico sorológico de seu rebanho, não sendo possível efetuar a substituição totalizando 9 rebanhos.

3.5.3 Cálculos estatísticos

Para avaliar se os dados apresentavam uma distribuição normal, as variáveis CCS, densidade óptica, índice de reatividade e tamanho do rebanho foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk.

Para avaliar associações estatísticas entre a densidade óptica e o tamanho do rebanho foi aplicado o Índice de Correlação de Spearman (ρ).

A sensibilidade (Se), a especificidade (Sp), o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do teste ELISA das amostras coletivas de leite foram calculados em relação ao teste de anel em leite e o grau de concordância entre os teste foi estimado pelo índice Kappa (THRUSFIELD, 2007). A interpretação do coeficiente de Kappa (κ) seguiu os seguintes critérios propostos por Pereira (2007) conforme disposto na tabela:

Tabela 3- Interpretação da concordância pelo coeficiente Kappa (κ) de acordo Segundo Pereira 2007

kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

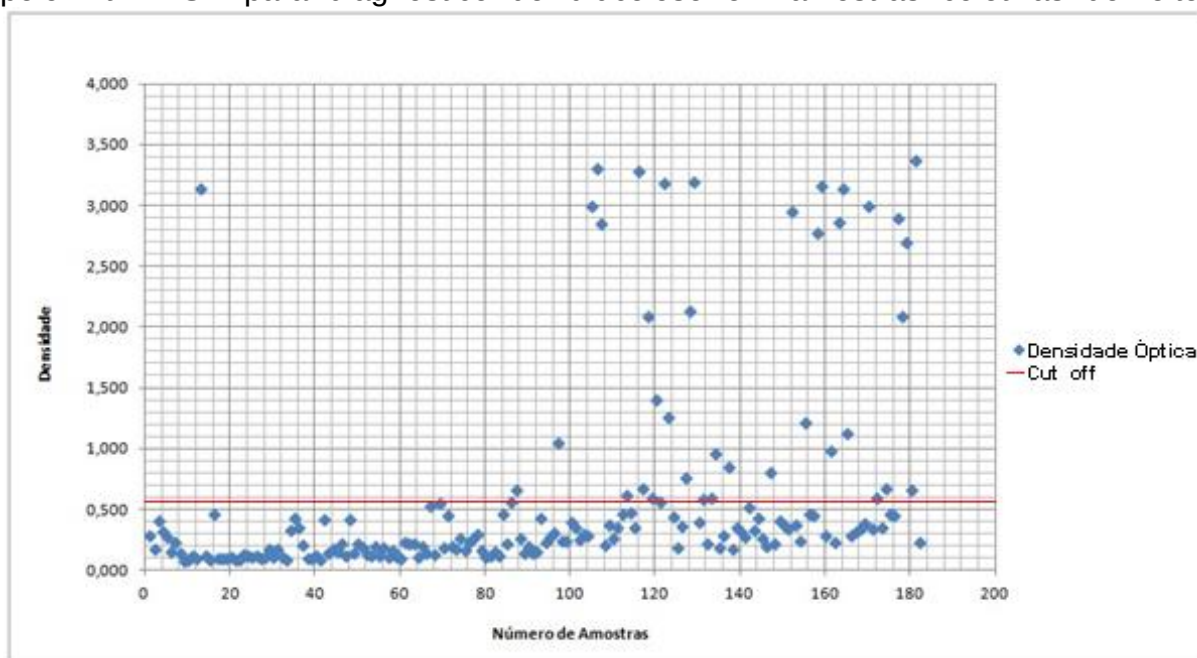
Fonte: Pereira 2007 adaptado.

3.6 Resultados

3.6.1 ELISA e TAL

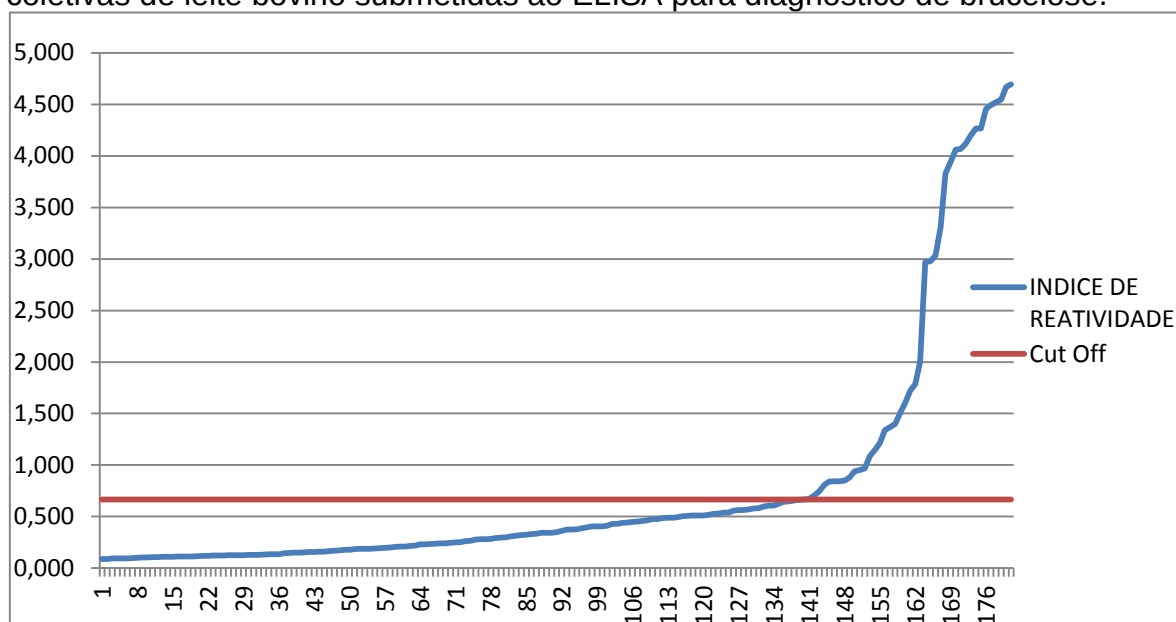
A análise da densidade óptica (DO) das amostras variou de 0,083 a 3,370. Os negativos se concentraram abaixo de 408 e os positivos acima de 590. Verificou-se que a média da DO das amostras positivas foi 1,780, e que a média da DO das amostras negativas foi de 0,207 como pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 - Densidade Óptica de 181 amostras coletivas de leite bovino analisadas pelo kit ELISA para diagnóstico de brucelose em amostras coletivas de leite.



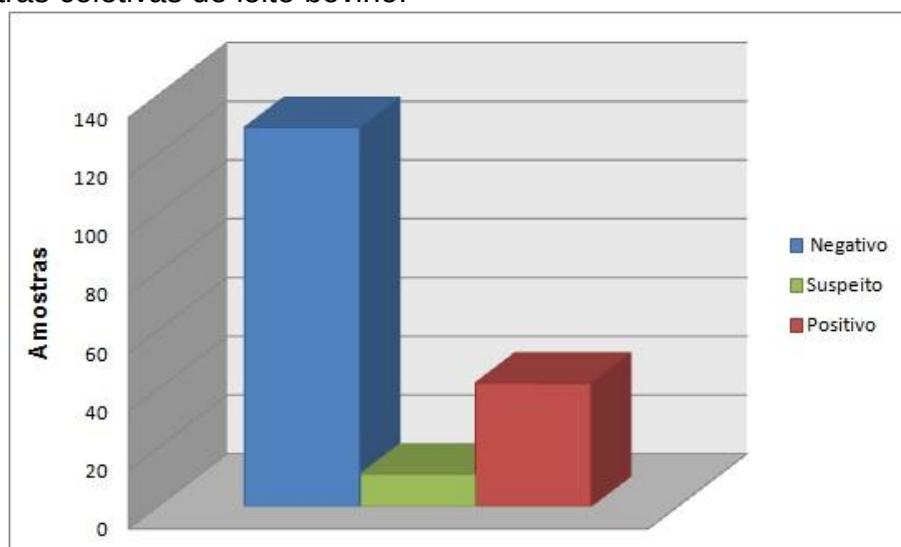
Os valores de IR obtidos no teste com amostras coletivas de leite variaram entre 0,043 e 4,787, apresentando um valor médio de 0,775. O limiar de reatividade (Cut off) estimado foi de $IR > 0,665$. Assim, das 181 amostras testadas, 42 apresentaram IR acima do cut off. Os resultados em índices de reatividade obtidos na pesquisa de anticorpos anti-*Brucella* foram ordenados em ordem crescente e expressos na Figura 5.

Figura 5 - Resultado de análise do Índice de Reatividade (IR) de 181 amostras coletivas de leite bovino submetidas ao ELISA para diagnóstico de brucelose.



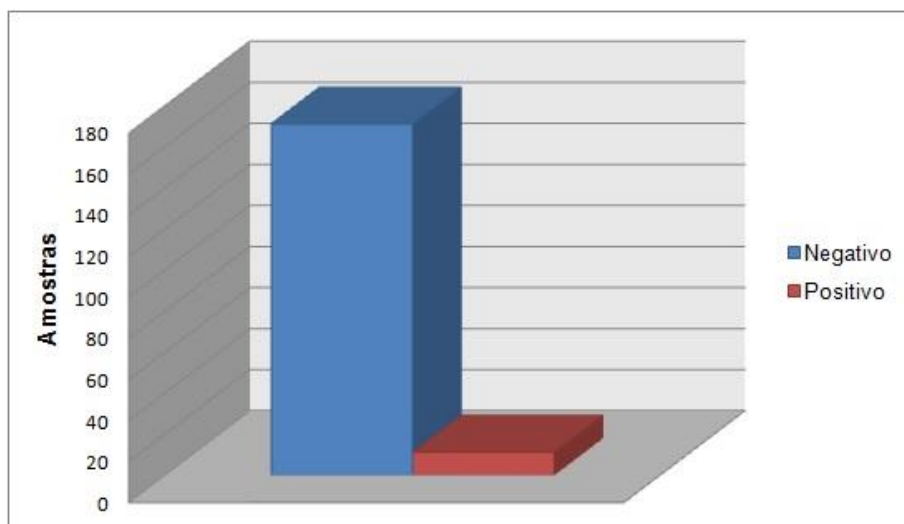
Das 181 amostras de leite submetidas ao ELISA indireto, 42 foram reagentes, porém de acordo com o fabricante do teste, 11 amostras apresentaram valores de densidade óptica considerados suspeitos, pois a relação entre densidade óptica da amostra e do controle ficou entre 0,45 e 0,55. Segundo os parâmetros estabelecidos pelo fabricante do teste, as amostras que se enquadrem dentro dessa faixa específica de densidade óptica não devem ser classificadas como negativas nem positivas (Figura 6).

Figura 6: Resultados do teste ELISA para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite bovino.



A análise das amostras pelo teste de anel em leite resultou em 11 amostras positivas e 170 amostras negativas, conforme pode ser visualizado na figura 7.

Figura 7 - Resultados do teste de anel em leite (TAL) para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite bovino



As dificuldades observadas na análise comparativa dos resultados obtidos neste estudo são decorrentes dos diferentes resultados possíveis. No teste ELISA existe a probabilidade de um resultado suspeito, o que não é possível quando se aplica o teste de anel em leite ou AAT. Dessa forma, optou-se por não incluir os resultados suspeitos do teste ELISA no cálculo dos indicadores.

Os resultados obtidos na comparação entre o teste ELISA e o TAL podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 4 – Comparação entre ELISA indireto e teste do anel em leite (TAL) para diagnóstico de brucelose em 181 amostras coletivas de leite.

ELISA	TAL		TOTAL (%)
	Positivo (%)	Negativos (%)	
Positivos	8 ^a (4,7)	34 ^b (19,9)	42 ^{a+b} (24,6)
Negativos	3 ^c (1,8)	125 ^d (73,7)	128 ^{c+d} (75)
TOTAL	11 ^{a+c} (6,4)	159 ^{b+d} (93,6)	170 ^{a+b+c+d} (100)

3.6.1 Sensibilidade

A capacidade do teste de identificar os indivíduos realmente doentes, dentre os infectados, portanto a sensibilidade, nas amostras foi calculada por:

$$S=(a)/(a+c) \times 100= 8/11 \times 100= 72,7\%$$

3.6.2 Especificidade

A capacidade do teste em identificar os negativos quando a doença não esta presente, portanto a especificidade, nas amostras foi calculada por:

$$E= (d) / (b+d) \times 100=125/1159 \times 100=78,6\%$$

3.6.3 Valor Preditivo Positivo

O valor preditivo positivo (VPP) tem a finalidade de expressar a probabilidade de realmente existir a doença quando o resultado do teste que está sendo avaliado é positivo:

$$VPP= (a)/ (a+b) \times 100=8/42 \times 100=19\%$$

3.6.4 Valor Preditivo Negativo

O valor preditivo negativo (VPN) é utilizado para expressar a probabilidade de não ocorrência da doença quando o resultado do teste é negativo.

$$VPN: (d) / (c+d) \times 100=125/128 \times 100= 97\%$$

3.6.5 Avaliação da concordância dos ensaios iELISA e TAL pelo índice Kappa

O índice de concordância entre o teste de referência e o teste ELISA foi avaliado por meio do indicador kappa, o qual foi interpretado de acordo com os

critérios de Pereira (2007). O coeficiente (k) observado foi de 0,22, sendo considerado sofrível.

3.6.6 Quantidade de animais por rebanho

A quantidade de vacas por rebanho variou de 6 a 400 animais em lactação, como pode ser observado na Tabela 4. Considerando cada amostra de leite analisada sendo formada por um pool de animais, o número total de animais foi de aproximadamente 14.480 e o tamanho médio do rebanho foi de 80 animais.

Tabela 5 – Quantidade de vacas em lactação por rebanho de 181 amostras coletivas de leite.

Tamanho do rebanho em lactação	Quantidade de rebanhos	%	Quantidade de Positivos ELISA	% Positivos
Até 40 vacas lactação	49	27	10	23,8
41 a 80 vacas em lactação	58	32	13	31,0
81 a 120 vacas em lactação	43	23	12	28,6
Acima 120 vacas em lactação	31	17	7	16,7
TOTAL	181	100	42	100

Os rebanhos com número entre 41 e 80 vacas corresponderam a 32% do total de amostras avaliadas. A maior parte das amostras reagentes ao teste ELISA, ou seja, mais de 30% do total de amostras positivas, são provenientes de rebanhos com a quantidade de vacas em lactação compreendida entre 41 e 80 vacas.

3.6.7 AAT e 2- Mercaptoetanol

O planejamento inicial foi idealizado para a coleta de sangue em 2 rebanhos de cada resultado possível entre as combinações dos testes de TAL e ELISA. Porém devido à desistência de um dos produtores, nos rebanhos em que a combinação dos resultados foi positivo no TAL e negativo no ELISA, apenas em um rebanho foi coletado material para realização de testes de AAT. Os resultados dos testes sorológicos individuais estão dispostos na tabela 5.

TABELA 6 - Resultados de testes sorológicos individuais para brucelose realizados em 9 rebanhos leiteiros 2014

Resultado TAL	Resultado ELISA	Qtde de rebanhos analisados	Qtde rebanhos positivos	Qtde de animais
Positivo	Positivo	02	02	30
Positivo	Negativo	01	0	10
Negativo	Positivo	02	0	30
Negativo	Suspeito	02	0	25
Negativo	Negativo	02	0	30
Total		9	2	125

Dentre os rebanhos selecionados para a realização de exames sorológicos individuais, 7 apresentavam mais de 100 vacas em lactação, sendo coletado sangue de 15 fêmeas aleatoriamente, em outros 2 rebanhos, a quantidade era inferior a 100 vacas, sendo coletado sangue de 10 fêmeas. Desta forma, foram analisados soros provenientes de 125 animais, dos quais 2 animais foram reagentes ao AAT. Os soros reagentes no AAT também foram submetidos ao teste de 2-ME sendo confirmados como positivos para Brucelose pelos testes oficiais do PNCEBT.

3.7 DISCUSSÃO

O sucesso de qualquer programa de controle de uma doença depende diretamente da eficiência dos testes de diagnóstico (EMBRAPA, 1994). Desta forma, é possível reduzir a disseminação do agente por meio da identificação e rápida retirada de animais infectados, que representam a principal fonte de infecção para outros animais, assim como para o homem.

Para que seja possível analisar a eficiência de um teste de diagnóstico, deve-se estabelecer um teste padrão cujos resultados sejam utilizados como referência em comparação com os resultados do teste que se deseja avaliar (GORDIS, 2004). Neste estudo, o TAL foi utilizado como referência, por ser o único teste oficial para amostras coletivas de leite do Regulamento Técnico do PNCEBT e por apresentar resultados de sensibilidade de 84,2% e especificidade de 97,1% em amostras coletivas de leite (BRASIL, 2006; SILVA-JUNIOR et al. 2007).

A avaliação de testes de diagnóstico depende do conhecimento prévio de algumas de suas características, como a sensibilidade, e a especificidade (SANTOS; FONSECA, 2007). A classificação de testes como negativos, suspeitos e positivos deixa lacunas na validação de técnicas de diagnóstico, pois altera de forma substancial características de análise e avaliação intrínsecas desses testes como sensibilidade e especificidade.

O teste ELISA analisado identificou 42 amostras positivas, o que corresponderia a uma prevalência de 24,6% dos rebanhos estudados, valores próximos aos 22,7% relatados por Sánchez-Villalobos et al. (2009) analisando amostras coletivas de leite provenientes de propriedades do município de Machiques de Perijá, na Venezuela.

Romero et al. (1995), em estudo para o diagnóstico da brucelose em rebanhos bovinos de leite, analisaram amostras individuais de leite por meio de ELISA indireto e obtiveram valores de 98,2% para sensibilidade e especificidade de 100%, sendo considerado um teste com elevado potencial para triagem de brucelose em rebanhos de leite.

Vanzini et al. (1998), analisando amostras de leite individuais por meio de um teste ELISA, relataram sensibilidade de 99,6% e especificidade de 99,1%, valores elevados, que sugerem o ELISA em amostras de leite como um teste de diagnóstico com elevado potencial de inclusão em programas oficiais de controle da brucelose.

Rivera et al. (2003) analisaram um teste ELISA indireto para detecção de *Brucella abortus* em amostras de leite, no qual foram avaliados 757 amostras de leite individuais e 766 amostras coletivas, totalizando 1.523 amostras. O ELISA em amostras individuais apresentou sensibilidade de 95,3% e especificidade de 95,1%, diferente dos valores apresentados no ELISA realizado em amostras coletivas de leite, que obteve 92,1% para a sensibilidade e 97,6% para especificidade.

Patel et. al. (2013), por meio de ELISA indireto aplicado em amostras coletivas de leite na região de Gujarat, na Índia, encontraram prevalência de brucelose de 33,7% para rebanhos, valores superiores aos 24,7% de rebanhos positivos encontrados pelo teste ELISA avaliado nesta pesquisa. Aulakh et al. (2008), analisando amostras individuais de leite em Punjab (Índia) por meio de ELISA relataram uma prevalência de brucelose de 20,4% para vacas e 16,4% para búfalas.

Vanzini et al. (2001), analisando um teste ELISA para brucelose em amostras coletivas de leite obtiveram valores de sensibilidade de 98,1% e especificidade de 90,5 %, superiores aos valores de sensibilidade (72,7%) e especificidade (78,6%) encontrados no teste avaliado neste estudo.

Lavaroni e Aguirre (2004), utilizando diversas provas sorológicas para diagnóstico em 2 rebanhos na Argentina, concluíram que o teste ELISA indireto aplicado em amostras individuais de leite apresentou valores de especificidade inferiores a outros testes avaliados como o ELISA competitivo aplicado a amostras de sangue, a fixação de complemento e o teste de PCR.

Cada teste de diagnóstico apresenta alguma característica que o destaca dos demais. A elevada sensibilidade apresentada pelo teste ELISA o torna uma ferramenta promissora para utilização como teste de triagem. Porém essa elevada sensibilidade também pode produzir efeitos indesejados, como grande número de falso-positivos, se não estiver aliada a uma elevada especificidade.

Em países onde ainda ocorre a vacinação sistemática de fêmeas, a presença de animais vacinados pode reduzir a especificidade de testes ELISA, elevando a ocorrência de reações falso-positivas (KERBY et al., 1997). Sutherland (1980) relatou que, na fase inicial de programas de erradicação da brucelose, o ELISA indireto não seria considerado a melhor opção de teste de triagem, pois nestas fases os programas de controle da doença são fundamentados na utilização de vacinas indutoras de anticorpos.

De acordo com Zimmerman (2010), o teste ELISA indireto para amostras de leite em estudo é utilizado em países como Inglaterra, Alemanha, França e Áustria. Esses países possuem situação epidemiológica diferente do Brasil, pois a vacinação de fêmeas não é mais parte integrante do programa de erradicação daqueles países. Dessa forma, as chances de reações falso-positivas certamente são menores. Assim, outros estudos devem ser realizados para que talvez sejam efetuados ajustes no ponto de corte do teste, de forma a adaptá-lo a realidade epidemiológica do local onde será introduzido o teste ELISA.

A elevada sensibilidade do teste ELISA o torna interessante para os países que estão em fases mais avançadas do programa de controle da brucelose e já alcançaram níveis de prevalência em que a vacinação deixou de ser parte integrante do programa de erradicação.

Apesar da relevância, poucos testes são aplicados em amostras coletivas de leite. A legislação estipula a responsabilidade das empresas em exigir de cada produtor os comprovantes de programas sanitários adequados ao rebanho, porém isso nem sempre ocorre. Quando se avalia o potencial do leite como meio de transmissão de brucelose, a responsabilidade pela segurança do produto não deve se limitar apenas ao produtor, mas também ser compartilhada pelas empresas responsáveis pela captação e processamento do leite cru.

O resultado positivo encontrado em 2 animais submetidos a exames sorológicos individuais de AAT, e confirmados pelo 2-mercaptoetanol, demonstra a existência de focos de brucelose em rebanhos leiteiros. Esses focos de brucelose são provenientes de rebanhos que foram considerados positivos no TAL e no ELISA simultaneamente, demonstrando certa eficiência quando os testes são utilizados em conjunto, levando-se em consideração que nenhum outro foco de brucelose foi encontrado por meio dos testes sorológicos individuais.

Apesar dos animais positivos para brucelose serem provenientes de propriedades com rebanhos entre 41 e 80 animais em lactação, e acima de 120 vacas em lactação respectivamente, a análise estatística não demonstrou haver relação significativa entre o tamanho do rebanho e a ocorrência da doença.

Borba et al. (2013), em pesquisa realizada no estado do Maranhão, identificaram como fator de risco para a doença no estado o tamanho do rebanho quando este era superior a 54 animais. Porém esses resultados podem estar simplesmente ligados ao maior número de animais testados (MARTIM et al., 1992).

5- CONCLUSÃO

O teste ELISA indireto em amostras coletivas de leite não apresentou desempenho satisfatório quando aplicado isoladamente como teste de triagem em amostras coletivas de leite.

A porcentagem significativa de amostras consideradas positivas no teste oficial para amostras coletivas de leite in natura (TAL) (3,8%) serve como alerta para os órgãos de sanidade animal e para as empresas que processam o leite in natura acerca dos possíveis riscos de transmissão de brucelose.

A existência de rebanhos leiteiros com focos de brucelose foi confirmada pela realização de exames individuais de AAT e 2- ME.

REFERÊNCIAS

- AULAKH, H. K.; PATIL, P. K.; SHARMA, S.; KUMAR, H.; MAHAJAN, V.; SANDHU, K. S.: A Study on the Epidemiology of Bovine Brucellosis in Punjab (India) Using Milk-ELISA. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77, n.3, p. 393-399, jun.2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)** Brasília, 2006.184p.
- BARRAL, A. FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA. **Imunização passiva e ativa**. 2005. Disponível em: <<http://www.medicina.ufba.br/imuno/aulas/vacinaspdf>>. Acesso em: 20 out. 2014.
- BORBA, M.R; STEVENSON, M.A., GONÇALVES, V.S.P. FERREIRA-NETO, J.S.; FERREIRA, F.; AMAKUA, M.; TELLES, E.O.; SANTANAE, S.S.; FERREIRA, J.C.A. LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; DIAS, R.A. Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhão State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, n. 2, p. 169-176, jun. 2013.
- BUTLER, J.E., MAXWELL, C.F. Preparation of bovine immunoglobulin's and free secretory component and their specific antiserum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.55, n.2, p.151-164, feb.1972.
- COLLING, A. Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. In: **International Atomic Energy Agency**. Vienna: IAEA, 1998. p.3-14.
- ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos em el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 31, n.1, p. 5-17, 1999.
- EMBRAPA. **Programa de controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV)**. Subprojeto Nº 06.0.94.102- 01. Relatório de consultoria. Sobral: Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, 1994. 125p.
- GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C.; DIAS, A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO, T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 35-34, jun. 2009.
- GORDIS, L. Avaliação da validade e da confiabilidade dos testes diagnósticos e de rastreamento. In: GORDIS, L. **Epidemiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p. 63-81.
- KERBY, P.J.; QUIROGA, J.L.; MCGRANE, J.J.; STAGG, D.A. Field evaluation of an indirect ELISA for detection of brucellosis in lowland Bolivia. **Tropical Animal Health Production**, v.29, n.2, p.65-72, mai.1997.

LANGONI, H. **Vacinas: Quando e como usá-las**. 2008. UNESP/ Botucatu/SP. Disponível em:<<http://www.spmv.org.br>>. Acesso em: 20 de ago. 2014.

LAVARONI, O.N; AGUIRRE, N.V. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. **Revista Argentina de Microbiología**, v.36, n.3, p.101-106, jul./set.2004.

MARTIN, S.W.; SHOUKRI, M.; THORBURN, M.A. Evaluation of health status of herds based on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1-2, p.33-43, out.1992.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JUNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.5,p.108-112, 2000.

MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; DIAS, H.L.T.; SOUZA, J.S.; VALE, W.G. Ocorrência de brucelose bovina no Estado do Pará confirmada por métodos sorológicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22,n. 3, p. 117-121, 2000.

MOLNAR, L.; MOLNAR, E.; TURY, E.; SOUSA, J. S. Concepções modernas para o diagnostico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n.4, p. 157-162, 1997.

MATHIAS, L.A.; MACMILLAN,A.P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico da brucelose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.15, p. 101-105,1995.

NIELSEN, K.; GALL, D.; KELLY, W.; VIGLIOCCO, A.; HENNING, D.; GARCIA, M. **Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis**. Nepean, Ontario: Animal Disease Research Institute. O.I.E. Reference Laboratory of Brucellosis. Agriculture and Food Canada, 1996.

PATEL,M. D.; PATEL, P. R.; PRAJAPATI, M. G.; KANANI, A. N., TYAGI, K. K. FULSOUNDAR, A. B. Prevalence and risk factor's analysis of bovine brucellosis in peri-urban areas under intensive system of production in Gujarat, India. **Veterinary Word**, v. 7, n. 7, p. 509-516, jul.2013.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia teoria e prática**. Rio de Janeiro:Guanabara koogan, 2007. 596p

RIVERA, A. D.Y.; RUEDA, O.E. ;CALDERON, C.P.; MARIÑO, O.C. ; GALL, J. D.; NIELSEN, K. Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Cundinamarca, Colombia. **Revue scientifique et technique de l'OIE**, v. 22, n.3, p. 1065-1075, 2003.

ROMERO, C.; PARDO, M.; M.J. GRILLO.; DIAZ, R.; BLASCO, J. M.; LOPEZ-GOÑI, I. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, dez.1995.

SAMARTINO, L.; BUFFONI, L.; CONDE, S.; GREGORET, R. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. **Revista de Medicina Veterinária**, v.82, n. 2, p. 90-94, 2000.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A.; VILLAROEL-NERI, R.; OVIEDO-BUSTOS, A.; ANDREA, G.; BOSCÁN-OCANDO, J.; PINTO-PATÍÑO, R.; PIRELA-LARRAZÁBAL, F.; BECERRA-RAMÍREZ, L.; LÓPEZ, E. Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* en fincas doble propósito del municipio Machiques de Perijá, Venezuela. Parte II: validez y seguridad de las pruebas Anillo de la Leche y Rosa de Bengala. **Revista Científica FCV-LUZ**, v.12, n.4.p.466-474, 2009.

SANGARI, F. J ; AGUERO, J; GARCIA-LOBO, J.M. Improvement of the *Brucella abortus* B19 vaccine by its preparation in a glycerol based medium. **Vaccine**, v. 14, n. 4, p. 274-276, march. 1996.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 328p.

SILVA-JUNIOR, F.F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.59, n.2, p.295-300, abr.2007.

SHAFEE, M.; RABBANI, M.; SHEIKH, A.A.; AHMAD, M.D.; RAZZAQ, A. Prevalence of Bovine Brucellosis in Organized Dairy Farms, Using Milk ELISA, in Quetta City, Balochistan, Pakistan. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-3, jan.2011.

SUTHERLAND, S. S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bull**, Fornham Royal, v.50, p.359-368, 1980.

SUTRA, L.; CAFFIN, J.P.; DUBRAY, G. Role of milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.12, n. 4, p. 359-366, nov.1986.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2007. 558p.

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N. P.; VALENTINI, B. S.; TORIONI, D. E.; ECHAIDE, S.; LUGARESI, C. I.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 55-60, sept. 2001.

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

VANZINI, V. R.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C. I.; DE ECHAIDE, S. T.; DE CANAVESIO, V. G.; GUGLIEMONE, A. A.; MARCHESINO, M. D.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 36, n. 3, p. 211-217, sept.1998.

CAPÍTULO 4 – USO DA TÉCNICA DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM AMOSTRAS COLETIVAS DE LEITE

RESUMO

Objetivando-se detectar DNA de *Brucella abortus*, a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foi empregada para analisar amostras de leite *in natura* provenientes de rebanhos destinados à produção de leite. Foram previamente selecionadas 90 amostras para realização da técnica de PCR, sendo 8 positivas no teste de anel em leite, 37 positivas no ELISA, 11 amostras suspeitas no ELISA e 34 amostras negativas em ambos os testes. A extração foi realizada por meio de lise enzimática, seguida de amplificação utilizando primers BAB e IS 711, que amplificam fragmentos de 498 pares de bases. A visualização foi realizada utilizando gel de agarose 1% em fotodocumentador Alpha Digi Doc. Não foi amplificado DNA de *Brucella abortus* em nenhuma das amostras analisadas, demonstrando a PCR não ser a melhor técnica para diagnóstico de brucelose em rebanhos, haja vista que nem sempre ocorre o escape desses micro-organismos pelo leite.

Palavras-chave: Pcr, *Brucella*, leite

CHAPTER 4 - BRUCELLOSIS DIAGNOSING IN COLLECTIVE MILK SAMPLES WHITH PCR

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique was used to detect *Brucella abortus* in samples of fresh milk from productive dairy herds. Ninety samples were preselected for the PCR test including 45 that tested positive in ELISA and/or MRT, 11 suspect in ELISA and 34 negative in both tests. Extraction was carried out by enzymatic lysis, followed by amplification using BAB and IS 711 primers, which amplify fragments of 498 base pairs. Visualization was accomplished with 1% agarose gel and an Alpha Digidoc Photo Documentation system. *Brucella abortus* DNA was not amplified in any of the samples, demonstrating that PCR is not the best screening technique for brucellosis in milk samples at the herd level, given that these microorganisms do not always escape into the milk.

Keys-word: Pcr. *Brucella*.milk.

Introdução

O diagnóstico direto por meio do isolamento bacteriano ainda é considerado o padrão ouro quando se procura identificar o agente responsável por uma determinada doença (ALTON et al., 1988).

Os testes de isolamento de bactérias do gênero *Brucella* são complexos, desta forma precisamos levar em consideração o longo período necessário para a identificação definitiva das bactérias desse gênero, que geralmente dura duas semanas. Nesse período, o produtor, o processador de alimentos ou mesmo o indivíduo acometido pela doença pode estar sujeito à privação de ações importantes para o controle dos riscos ou mesmo da própria doença (BRICKER, 2002).

Os testes de isolamento das bactérias do gênero *Brucella* devem ser realizados em laboratórios autorizados com biossegurança compatível e por pessoal altamente habilitado. A natureza zoonótica da maioria das espécies de *Brucella* se configura em perigo potencial para o pessoal do laboratório que deve manipular o agente infeccioso durante os testes. Por fim os resultados negativos não são sempre definitivos (BRICKER, 2002).

A reação em cadeia de polimerase (PCR), desenvolvida na década de 80 por Mullis e Saiki, possibilita a amplificação enzimática *in vitro* de um determinado segmento de DNA. Essa amplificação pode chegar a grande número de cópias partindo de um único molde de DNA, aliando um alto grau de sensibilidade e de especificidade (BELAK; PORDÁNY, 1993; MULLIS; FERRÉ; GIBBS, 1994).

A aplicação da PCR possibilita a utilização de amostras com micro-organismos que foram inativados, reduzindo os riscos quando se utilizam agentes de elevado potencial zoonótico, como no caso específico das bactérias do gênero *Brucella* (FOSTER et al., 2008). O diagnóstico direto baseado em técnicas moleculares tem sido aplicado de forma crescente para o diagnóstico de agentes infecciosos em medicina humana e veterinária. Atualmente várias técnicas derivadas da PCR estão disponíveis e com atuação em diversas finalidades (WISCHRAL; GOMES, 2009).

A PCR tem se mostrado uma grande aliada na identificação de patógenos cujo isolamento ou mesmo a classificação são problemáticos, pois teoricamente tem a capacidade de detectar poucas cópias de DNA. Outra vantagem desta técnica consiste no fato de não necessitar de grandes cuidados na colheita e transporte das

amostras, uma vez que o DNA mantém-se íntegro, mesmo que o agente esteja inviável (MALORNY et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004).

A utilização da PCR representa uma técnica alternativa ao isolamento microbiológico, capaz de detectar um segmento de DNA específico de *Brucella* em materiais suspeitos. Suas principais vantagens são: rapidez quando comparada ao isolamento e alta especificidade, pela utilização de primers específicos com sequências de DNA (XAVIER et al., 2010).

A tecnologia de PCR tem sido aplicada à detecção de contaminação por *Brucella* em alimentos, principalmente leite e queijos frescos. Ênfase tem sido dada à sua aplicação em leite, por este se constituir em amostra diagnóstica assim como em alimento, sendo esta considerada uma das principais formas de aquisição da brucelose humana (BRICKER, 2002).

O leite, quando utilizado como fonte de material para extração de DNA, além de reduzir o estresse dos animais no momento da coleta do material, ainda possibilita a formação de pools de amostras, permitindo elevar o diagnóstico ao nível de rebanho (PSIFIDI; DOVAS; BANOS, 2010).

O teste de PCR é realizado em três etapas, a extração do ácido nucleico contido na amostra, sua ampliação e por fim a visualização do produto. Os pontos críticos estão relacionados com a escolha correta dos *primers* a serem empregados e a qualidade de extração do DNA (COLLINS et al, 1994).

A reação depende basicamente da construção de oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, complementares às extremidades que delimitam a região-alvo. A repetição de ciclos de temperaturas definidas possibilita a desnaturação, o pareamento e a extensão dos *primers*, resultando na multiplicação exponencial do fragmento genético em estudo, tendo em vista que cada fita de DNA formada serve como molde para o próximo ciclo de replicação. Em poucas horas, depois de algumas dezenas de ciclos, haverá milhões de cópias do fragmento de ácido nucleico alvo (XU; LARZUL, 1991).

A preparação da amostra é fator determinante para o sucesso da extração, pois a maioria das fontes apresenta fatores inibidores da PCR. O processo comum de extração envolve lise celular para liberação do DNA bacteriano, mas frequentemente libera também o DNA do hospedeiro, o que constitui um fator de interferência (BRICKER, 2002).

Mesmo obtendo-se sucesso na extração, a existência de fatores de inibição de amplificação do ácido nucleico, como proteínas séricas, debris celulares somáticos, polissacarídeos e outros componentes dos fluídos corpóreos, pode interferir negativamente no teste devido à inviabilização do processo de amplificação do DNA (WILSON, 1997).

A preocupação com a qualidade do leite comercializado deve ser compartilhada entre produtores e usinas de beneficiamento. A indústria não deve abrir mão de seu importante papel de fiscalizar a segurança e inocuidade do leite captado. Desta forma, deve procurar sempre desenvolver e aplicar metodologias que permitam a análise objetiva sobre a segurança sanitária do leite e consequentemente, a sanidade dos animais em lactação.

Diante das limitações inerentes ao diagnóstico direto por meio do isolamento e devido aos fenômenos que podem restringir o diagnóstico por meio de sorologia, é importante e necessário a busca e o desenvolvimento de novas alternativas que complementem o diagnóstico da brucelose.

O objetivo da pesquisa foi utilizar a técnica de reação em cadeia de polimerase para a detecção de bactérias do gênero *Brucella* em amostras coletivas de leite obtidas a partir de tanques de expansão de propriedades com rebanhos leiteiros.

4. 2 Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais – CEUA da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo 019/14 (anexo 1)

4.2.1 Amostragem

As amostras foram selecionadas levando em consideração testes de diagnóstico realizados anteriormente de leite *in natura* provenientes de tanques de expansão, visando verificar a amplificação de DNA de *Brucella spp.* Para isso 8 amostras positivas no TAL, 37 amostras que foram classificadas como positivas no ELISA, e 11 amostras suspeitas no ELISA foram selecionadas para realização da técnica de diagnóstico por PCR. Para elevar o número de amostras processadas,

também foram incluídas 34 amostras negativas em ambos os testes, totalizando 90 amostras analisadas pela técnica de PCR.

4.2.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA de *Brucella* em leite foi utilizado o protocolo de extração por meio de lise enzimática com Proteinase K e purificação com fenol clorofórmio (Adaptado de BIASE et al., 2002).

Inicialmente, 400 µL foram centrifugados a 10.000x g por 15 minutos a 4°C; o sobrenadante foi descartado, para que os sedimentos e as células de bactéria pudessem se concentrar no fundo do tubo. O sedimento foi transferido para tubos plásticos (2 mL) e acrescentados a esse material 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 25 mM pH 8.0, NaCl 400 mM, SDS 0,5% (p/v)]. Em seguida, foram acrescentados 20 µL de Proteinase K 10 mg/mL, e as amostras foram agitadas em vórtex e mantidas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo invertidas suavemente a cada 10 minutos..

Adicionounaram-se 400 µL de acetato de potássio 5M à solução, que foi homogeneizada por inversão. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentado 700 µL de fenol: clorofórmio; álcool- isoamílico (25:24;1). As amostras foram homogeneizadas por inversão durante três minutos e posteriormente centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos.

Acrescentaram-se ainda 700 µL de clorofórmio:álcool-isoamílico (24;1). Após, as soluções foram homogeneizadas por inversão por três minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, a fase superior foi transferida para tubos novos, tomando-se cuidado para não tocar na interface orgânica. Acrescentaram-se 1.000 µL de etanol absoluto gelado, que após ser suavemente misturado foi mantido em freezer - 20°C *overnight*.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 1.000 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar em temperatura ambiente $\pm$ 25°C por 60 minutos. Em seguida, o *pellet* foi

ressuspendido em 30 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) por 24 horas a 4 °C. Após esse período, as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

As amostras foram submetidas á eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo Sybr safe gel stain 10 x (invitrogen) e padrão de concentração de 100 pb DNA (invitrogen) para verificação da qualidade e quantidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em fotodocumentador Alpha Digi Doc (Alpha Innotech).

4.2.3 Controle Positivo

Para o controle positivo foi utilizado o DNA proveniente da cepa vacinal RB 51 (laboratório Schering-Plough), obtido pela extração com o Wizard Genomic DNA Purification Kit da Promega, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para amplificação do fragmento de DNA de *Brucella abortus* foram utilizados os *primers* BAB e IS711, que amplificam fragmentos de 498 pb, cujas sequências estão expostas na tabela 6 e foram descritos por Bricker e Halling (1994).

Tabela 7 – Sequência dos *primers* utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de *Brucella abortus*

“Primers”	Sequência
BAB	5’ GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC 3’
IS 711	5’ TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT 3’

Fonte : BRICKER; HALLIG (1994)

A amplificação foi realizada conforme o seguinte protocolo: tampão de reação 1 x [200 mM Tris- HCl pH 8.4 500 mM KCl]; 0,2 mM de dNTPs [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]; MgCl₂ 2 mM; primers BAB, IS711 5 pmol/ µL; Taq DNA polimerase 5 U/ µL; DNA total 6 µL; água MiliQ q.s.p. 20 µL.

O volume final da solução para amplificação foi de 20 uL, sendo 6 µL de amostra e 14 µL de mix. O programa utilizado no aparelho termociclador Select

Cycler (BioProducts) para amplificação do fragmento de *Brucella abortus* foi realizado conforme a Tabela 7.

Tabela 8 – Programa utilizado para amplificação do fragmento de DNA de *Brucella abortus*.

Etapa	Tempo	Temperatura
Desnaturação inicial	5 minutos	94 °C
Desnaturação do DNA	60 segundos x	94 °C
Hibridação	60 segundos x	55 °C
Extensão da cadeia de DNA	60 segundos x	72 °C
Extensão Final	10 minutos	72 °C

FONTE; MIYASHIRO et al. (2007)

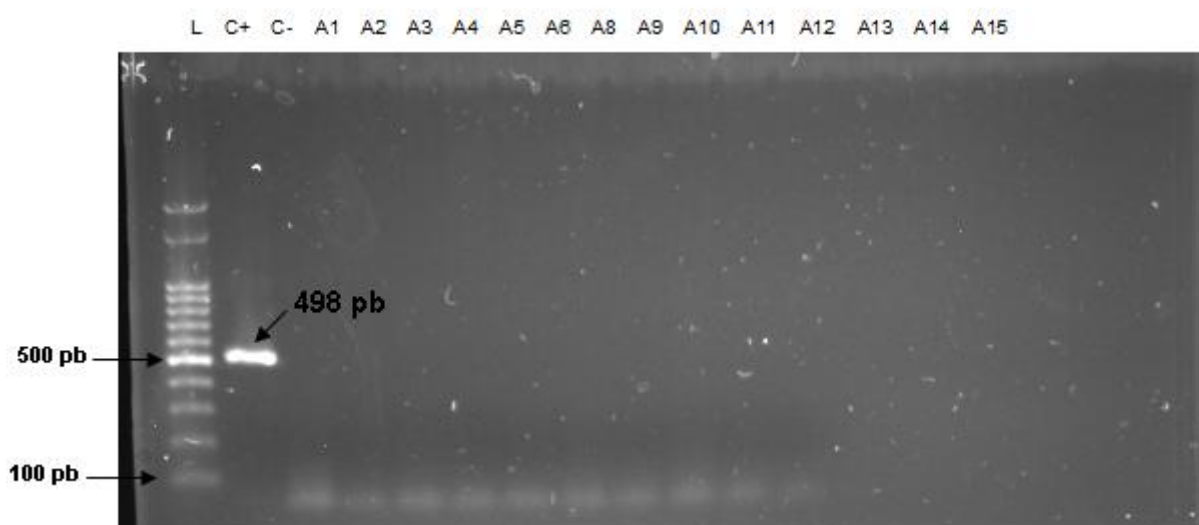
A visualização do produto amplificado (8 µL) foi realizada por meio da técnica de eletroforese em cuba horizontal com tampão de corrida TBE (0,5X) em gel de agarose 1% (p/v). Foi adicionado o corante Sybr Safe Gel Stain 10.000X- Invitrogen, 0,5 uL/10mL. O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm e a visualização das bandas realizada em transluminador ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989)

As bandas foram comparadas com o padrão de peso molecular (Invitrogen) com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas. Os géis foram visualizados sob luz UV em fotodocumentador Alpha Digi Doc (Alpha Innotech), sendo considerados positivos os fragmentos com 498 pb.

4.3 Resultados

Todas as amostras testadas foram negativas, não sendo observada a amplificação de DNA em nenhuma das amostras coletivas de leite selecionadas para a realização da PCR, conforme pode ser visualizado na figura 7.

Figura 8: Resultado obtido por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura* provenientes de tanques de expansão



Onde (L): marcador ; (C+): Controle Positivo; (C-): Controle Negativo (A): Amostra

4.4 Discussão

Muitos fatores devem ser analisados na utilização do teste de PCR, e a eliminação de fatores que podem inibir a amplificação de ácido nucleico é fundamental para o sucesso do teste. Todas as etapas desde a extração do DNA, a atividade da DNA polimerase ou a degradação ou captura dos ácidos nucleicos devem ser minuciosamente controlados e revisados (WILSON, 1997).

Os resultados obtidos quando se comparam a sorologia e a bacteriologia tem sido sempre variáveis. Alguns fatores podem ser responsáveis pelos resultados negativos na amplificação de DNA de *Brucella*, como o estágio da infecção, que pode influenciar no número e a localização das bactérias e a presença de grandes quantidades de DNA bovino, que pode inibir a PCR (SEÓNADH et al., 2005).

Um dos fatores que podem explicar a ausência de amplificação do DNA de *Brucella abortus* talvez seja a baixa quantidade de micro-organismos presentes nas amostras, que foram retiradas a partir de tanques de expansão com volumes variados. Dessa forma, o grau de diluição pode ser um fator de limitação na obtenção de DNA, o que torna o tamanho do rebanho, assim como a produção, um fator de interferência no teste.

Em infecções agudas é esperado que a *Brucella*, distribuída via hematogênica, esteja presente em todos os órgãos das fêmeas (GALLIEN et al., 1998). Porém, quando a infecção não se encontra mais na fase aguda, existe a possibilidade da bactéria se limitar a determinados tecidos, não sendo necessariamente excretada pelo leite.

Em pesquisa de Mosquera et al. (2008) analisando amostras de sangue e leite, 50% das amostras que foram positivas em PCR no sangue, foram negativas quando analisados por PCR em leite. Segundo o autor, esse resultado se deve ao fato de, mesmo presente no sangue, as bactérias não estavarem sendo excretadas no leite.

Mesmo apresentando resultado negativo em todas as amostras testadas, não se pode afirmar que não exista o escape de *Brucella* pelo leite de animais em lactação, em algum dos rebanhos analisados. Considerando o elevado tamanho de alguns rebanhos, assim como o volume total de leite contido no tanque de expansão do qual foi retirada a amostra, existe a possibilidade do volume amostral não ser representativo em relação ao volume do tanque de expansão quando se considera a prevalência da doença.

A capacidade de detecção de anticorpos pelo leite em testes como o ELISA e o TAL, sem que a PCR tenha a capacidade de recuperar o DNA de *Brucella*, também pode estar relacionada à velocidade de resposta do sistema imune.

A presença de anticorpos também é fator relevante, pois apesar da possibilidade de se encontrar diferentes concentrações de *B. abortus* no leite proveniente de vacas infectadas, a presença simultânea de anticorpos específicos circulantes no organismo pode contribuir para reduzir tanto a quantidade quanto a viabilidade dos microorganismos.

Pacheco (2007) extraiu DNA de amostras individuais de leite de 14 vacas de diferentes faixas etárias (3 a 9 anos) adequadamente vacinadas contra brucelose durante um ciclo reprodutivo completo (desde a sincronização de cio até 30 dias pós-parto). A análise das 210 amostras de leite resultou em 5,7% de amostras positivas, o que confirma a multiplicação da *Brucella* no organismo das fêmeas bovinas, bem como sua excreção de forma intermitente pelo leite.

Miyashiro et al. (2007), em pesquisa avaliando a detecção de DNA de *B. abortus* em queijos clandestinos em diferentes regiões dos estados de São Paulo e Minas Gerais encontraram DNA de *Brucella* spp. em 19,2% das amostras

analisadas. Todas as amostras positivas foram identificadas como *Brucella abortus*, das quais 81% eram pertencentes a cepa vacinal e 19% pertencentes a cepa de campo.

Segundo Akhtar et al. (2010), a técnica de extração de DNA de *Brucella*, por meio de PCR, se mostrou mais apropriada quando a extração de DNA foi realizada a partir do soro do que a realizada a partir de amostras de leite, devido a proteínas presentes no leite que dificultam a extração do DNA do organismo.

Saleha et al. (2014) em pesquisa de comparação entre métodos de diagnóstico para brucelose em amostras de leite e sangue, obtiveram elevada sensibilidade para o PCR, o que os levou a considerá-la o teste padrão ouro em sua pesquisa.

Lavaroni et al. (2004), estudando dois rebanhos, dos quais um infectado e outro livre de brucelose, obtiveram resultados de 100% de sensibilidade e especificidade para a técnica de PCR, conseguindo extrair DNA de *Brucella* spp em todas 14 amostras positivas de leite e sangue simultaneamente.

O fato de não se encontrar DNA de *Brucella abortus* nas amostras não significa que não exista a infecção nos rebanhos estudados, haja vista que em alguns animais, ou mesmo em determinadas fases do ciclo reprodutivo, pode não ocorrer o escape de micro-organismos pelo leite de forma constante.

5 Conclusão

A técnica de PCR aplicada a amostras coletivas de leite não se mostrou eficiente em promover a amplificação de DNA de *Brucella abortus*.

REFERÊNCIAS

- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques For The Brucellosis Laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique.** Paris, p.13-61, 1988.
- BELÁK, S.; PORDÁNY, A. B. Applification of the polymerase chain reaction (P.C.R.) in veterinary diagnostic virology. **Veterinary Research Communications**, v.17, p. 55-72 .1993.
- BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R.; ANTUNES, R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, [S.l.], v.25, n.3, p.313-315, ago.2002
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 62**, Brasília, 2011. p.1-24.
- BRICKER, B.J. PCR as diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 435-436, mês. 2002.
- BRICKER, B. J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, nov.1994.
- COLLINS, D. M.; RADFORD, A. J.; LISLE, W.; BILMAN-JACOB, H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 83-94, mai.1994
- FOSTER, J.T.; OKINAKA R.T.;SVENSSON, R.; SHAW, K. De K.B.; ROBISON, R.A.; PRO-BERT, W.S.;KENEFFIC, L.J.; BROWN, W.D. ;KEIM, P. Real-Time PCR assays of single-nucleotide polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 296-301, jan. 2008.
- GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; STAAL. C; PROTZ, D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction.**Veterinary Record**, v.142, n.19, p 512-14, mai.1998.
- LAVARONI, O.N; AGUIRRE, N.V. Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis en un rebaño lechero infectado con *Brucella* spp. **Revista Argentina de Microbiología**, v.36, n.3, p.101-106, jul./set.2004.
- MALORNY, B., TASSIOS, P.T., RANDSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p.39-48, mai.2003.

MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MOSQUERA, X, M. C.; BERNAL, C. V.; MUSKUS, C.L.; BERDUGO, J. G. Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. **Revista MVZ Córdoba**, v. 13.n.3, p. 00-00, dez. 2008.

MULLIS, K. B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R. A. **The polimerase chain reaction**. Boston: Brirkhäuser, 1994. 406-12p.

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**. 2007. Dissertação (Mestrado Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PSIFIDI A., DOVAS C.I. & BANOS G. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. **Molecular and cellular probes**.v. 24, n. 2, p. 93-98. abr.2010.

RODRIGUES, M.A.; SERAFINI, A.B.; PEREIRA, M. DE S.; DA SILVA, T.D.; RABAHI, M.F.; ALVES, S.L.; KIPNIS, A. Standardization of in-house polymerase chain reaction for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* at the reference Tropical Disease Hospital in the State of Goiás, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 4, p. 415-419, jun.2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957p.

WILSON I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.10, p. 3741-3751, out. 1997.

WISCHRAL, A.; GOMES-FILHO, M.A. Aplicações da biologia molecular na reprodução animal, **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Suplemento), n.6, p.59-63, 2009.

XAVIER, M.N.; SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; MOUSTACAS, V. S.; CARVALHO, C.A. JR.; SANT'ANNA, F.M.; ROBLES, C.A.; GOUVEIA, A.M.; LAGE, A.P.; TSOLIS, R.M.; SANTOS, R.L. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. **Veterinary Microbiology**, v.145, n.1-2, p.158-164, set. 2010

XU, L. Z.; LARZUL, D. The polymerase chain reaction: basic methodology and applications. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.14, n.3, p.209-221, 1991.

Considerações finais

A erradicação da brucelose é um processo lento e sujeito a vários fatores de interferência, mas que pode ser alcançado, desde que haja o comprometimento de produtores, indústrias, comerciantes e do Serviço de Defesa Agropecuária.

A educação sanitária é fator fundamental para que se alcancem resultados mais consistentes no combate à brucelose, pois o acesso à informação permite ao produtor a percepção real dos prejuízos relativos à doença e principalmente dos riscos a que estão expostas as pessoas que têm contato com animais brucélicos.

O sucesso de qualquer programa de controle e erradicação de uma doença como a brucelose é dependente de veterinários qualificados, produtores conscientes e um serviço de Defesa Agropecuária bem estruturado e atuante, não só por viabilizar ações relativas ao plano de controle mas também através de ações frequentes de fiscalização.

A pesquisa visando o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e o aperfeiçoamento dos testes existentes deve ser constante, pois a retirada dos animais acometidos pela doença de forma rápida e precisa reduz a disseminação da bactéria pelo rebanho, propiciando a redução significativa nas taxas de incidência e prevalência. Testes mais específicos podem reduzir prejuízos, pois estão menos sujeitos a reações cruzadas, que poderiam conduzir a sacrifícios desnecessários de animais sadios.

A saúde animal afeta diretamente a saúde pública, assim o consumo de leite e derivados que não passaram por processos que atestem sua segurança pode transmitir diferentes tipos de doenças, dentre elas a brucelose. A existência de rebanhos produtores de leite com focos de brucelose demonstra falhas em programas sanitários adotados por produtores que representam sérios riscos a trabalhadores e consumidores.

Diante do risco de transmissão da brucelose pelo leite, as usinas de beneficiamento de leite e os laticínios também têm responsabilidade no controle da brucelose, pois a vacinação para brucelose e a comprovação da sanidade do rebanho devem ser exigências básicas para comercialização de leite. Além de controlar a qualidade da matéria-prima recebida, a monitoria do processo de pasteurização, esterilização ou processamento para elaboração de derivados deve ser constante, a fim de garantir a segurança do produto

APÊNDICE A - Estatística do capítulo 2

Estatística descritiva CCS

Variable	CCS
Sample size	181
Lowest value	26.0000
Highest value	2912.0000
Arithmetic mean	614.2818
95% CI for the mean	548.6028 to 679.9607
Median	496.0000
95% CI for the median	449.1648 to 570.1670
Variance	200527.9035
Standard deviation	447.8034
Relative standard deviation	0.7290 (72.90%)
Standard error of the mean	33.2850
Coefficient of Skewness	2.0221 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	5.6091 (P<0.0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.8212 reject Normality (P<0.0001)

Teste de Correlação De Spearman Ccs X Tal

Variable Y	TAL
Variable X	CCS
Sample size	181
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	0.0204
Significance level	P=0.7856
95% Confidence Interval for rho	-0.126 to 0.166
Kendall's Tau	0.0167
Significance level	P=0.7416
95% Confidence Interval for Tau ^a	-0.0948 to 0.137

APÊNDICE B – Estatística Capítulo 3

Estatística descritiva DENSIDADE ÓPTICA

Variable	DENS._OPTICA
Sample size	181
Lowest value	<u>83.0000</u>
Highest value	<u>3370.0000</u>
Arithmetic mean	590.1657
95% CI for the mean	467.4468 to 712.8847
Median	278.0000
95% CI for the median	233.6659 to 333.5011
Variance	700077.5502
Standard deviation	836.7064
Relative standard deviation	1.4177 (141.77%)
Standard error of the mean	62.1919
Coefficient of Skewness	2.3736 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	4.3394 (P<0.0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.5738 reject Normality (P<0.0001)

Estatística descritiva ÍNDICE REATIVIDADE

Variable	I._REAT
Sample size	181
Lowest value	<u>43.0000</u>
Highest value	<u>4787.0000</u>
Arithmetic mean	731.0939
95% CI for the mean	555.3786 to 906.8093
Median	280.0000
95% CI for the median	169.6636 to 364.1716
Variance	1435298.4522
Standard deviation	1198.0394
Relative standard deviation	1.6387 (163.87%)
Standard error of the mean	89.0496
Coefficient of Skewness	2.3777 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	4.4867 (P<0.0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.5826 reject Normality (P<0.0001)

ESTATISTICA DESCRITIVA REBANHO

Variable REBANHO

Sample size	181
Lowest value	<u>6.0000</u>
Highest value	<u>400.0000</u>
Arithmetic mean	80.0110
95% CI for the mean	70.8114 to 89.2107
Median	71.0000
95% CI for the median	56.8330 to 78.0000
Variance	3934.3110
Standard deviation	62.7241
Relative standard deviation	0.7839 (78.39%)
Standard error of the mean	4.6622
Coefficient of Skewness	2.3560 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	8.8984 (P<0.0001)
Shapiro-Wilk test	W=0.8082
for Normal distribution	reject Normality (P<0.0001)

RELAÇÃO REBANHO X INDICE REATIVIDADE

Variable Y I._REATIVIDADE

Variable X REBANHO

Sample size	181
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	0.0971
Significance level	P=0.1934
95% Confidence Interval for rho	-0.0494 to 0.240
Kendall's Tau	0.0618
Significance level	P=0.2169
95% Confidence Interval for Tau ^a	-0.0532 to 0.150

CALCULO DE KAPPA

Observer A	TAL_1		
Observer B	ELISA_1		
	Observer A		
Observer B	POS	NEG	
NEG	125	3	128 (75.3%)
POS	34	8	42 (24.7%)
	159 (93.5%)	11 (6.5%)	170
Weighted Kappa ^a	0.222		

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 019/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Utilização de teste ELISA indireto, PCR e do teste do Anel em Leite para pesquisa de anticorpos contra brucelose em leite proveniente de tanques de expansão na região de Uberlândia”, sob a responsabilidade da **Profª. Drª. Anna Monteiro Correia Lima** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **10 de outubro de 2014**.

(We certify that the protocol nº 019/14, about “Utilização de teste ELISA indireto, PCR e do teste do Anel em Leite para pesquisa de anticorpos contra brucelose em leite proveniente de tanques de expansão na região de Uberlândia”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 10/10/2014).

Uberlândia, 13 de outubro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU