

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 10 (4)

August 2017

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=450&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Provas do Antígeno Acidificado Tamponado e de Reação em Cadeia pela Polimerase no diagnóstico da brucelose bovina em animais abatidos em frigorífico de Mato Grosso

Card Test and Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of bovine brucellosis in culled animals in a slaughterhouse at Mato Grosso

L. B. Lopes, C. Eckstein, V. S. Moustacas, M. F. d'Ornellas, H. L. S. Ponce

Embrapa Agrossilvipastoril

Author for correspondence: luciano.lopes@embrapa.br

Resumo. A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa zoonótica de caráter crônico, causadas por bactérias do gênero *Brucella*, que acometem os animais e o homem. A doença apresenta-se endêmica no Brasil, resultando em prejuízos econômicos tanto sob o ponto de vista de produção bovina quanto de saúde pública. O presente estudo tem o objetivo de demonstrar a ocorrência de animais reagentes com base no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), comparando os resultados com a ocorrência das lesões macroscópicas no pós-abate e identificação do DNA bacteriano pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Foram obtidas amostras de sangue imediatamente após a insensibilização dos animais e coletados também os linfonodos nas linhas de abate. Associada à coleta de material para o diagnóstico laboratorial, fez-se a inspeção em busca de lesões macroscópicas, seguindo a rotina do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do frigorífico localizado no município de Colíder/MT. Do total de 622 amostras, 14,3% foram positivos segundo o teste do AAT. Pelo teste de *Kappa* o valor igual a 0,1051 há uma baixa concordância ente os testes do AAT e PCR. De acordo com o teste de McNemar, a ocorrência dos resultados é significativamente diferente entre os dois testes.

Palavras-chave: Brucelose, epidemiologia, bovina.

Abstract. Brucellosis is a zoonotic infectious disease is a chronic condition caused by bacteria of the genus *Brucella*, which affect animals and man. The disease has become endemic in Brazil, resulting in economic losses both from the point of view of beef production and public health. This study aims to demonstrate the occurrence of animal reagents based on card test (CT), comparing the results with the occurrence of gross lesions at post - slaughter and identification of bacterial DNA by the technique of chain reaction by (PCR). Blood samples were obtained immediately after animals stunning were also collected and the lymph nodes in the slaughter lines. Associated with the collection of material for laboratory diagnosis, made up the inspection for macroscopic lesions, following the routine of the Federal Inspection Service (SIF) of the cattle slaughterhouse located in the municipality of Colíder/MT. In total, 622 blood samples were collected, 14.3% were positive according to the test of CT. According to Kappa test, there is a poor correlation entity tests. Based on the McNemar test, the occurrence of the results is significantly different between the two tests.

Keywords: Brucellosis, epidemiology, cattle.

Introdução

A brucelose é uma doença infectocontagiosa de distribuição mundial, acarretando problemas sanitários e prejuízos econômicos para pecuária nacional (Poester et al., 2002; Brasil, 2006). A doença pode ser diagnosticada em qualquer rebanho, independente do sistema de produção e/ou criação e exploração econômica na qual seja submetido (Lage et al.,

2008). No Brasil, estima-se o prejuízo total da doença em aproximadamente R\$ 892 milhões (Santos et al., 2013). Além do comprometimento dos índices reprodutivos, queda na produção e do envolvimento com a saúde pública por ser uma zoonose, a doença tem um caráter econômico importante, representando um impacto significativo no comércio de subprodutos de origem animal (Paulin & Ferreira Neto, 2002; Paulin & Ferreira

Neto, 2003). Barreiras não tarifárias têm sido empregadas por alguns países dificultando ou mesmo restringindo o comércio de animais e carne, comprometendo a viabilidade econômica de alguns setores. A posição de destaque do agronegócio brasileiro no mercado mundial aumenta sua exposição a problemas técnicos e de interesse comercial.

Em um trabalho em rede realizado em vários estados brasileiros (Poester et al., 2009), Negreiros et al. (2009) avaliaram a prevalência de focos e de animais soropositivos, e constataram a alta prevalência de brucelose em rebanhos no estado de Mato Grosso.

A utilização de testes diagnósticos em rebanhos ou em frigoríficos fornece dados sobre a situação epidemiológica, permitindo assim a detecção de focos de doenças e a adoção de medidas de controle (Silva Junior, 2008). No entanto, na rotina de frigoríficos o diagnóstico é baseado na identificação de lesões inflamatórias sugestivas à ocorrência de brucelose pelos (Sola, 2011). Entretanto, alguns animais infectados podem não apresentar alterações clínicas nas carcaças ou ainda podem ser pouco evidentes, dificultando a identificação pelo serviço de inspeção. Por exemplo, as bursites da cernelha de bovinos são de difícil visualização à inspeção ante-mortem, sendo de pouco valor a tentativa de separar os animais suspeitos (Langenegger et al, 1975).

Em um levantamento realizado no município de Colíder pelo SIF 4268, entre os anos de 2009 e 2013 foram encontrados 117 casos de bursite cervical e outros 52 de artrite no exame *post-mortem*. Entre 2011 e 2012, foram coletadas amostras de sangue e tecidos de 40 animais dos que apresentaram lesões macroscópicas na inspeção *post-mortem*. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de 36 animais reagentes na sorologia, sendo que 21 obtiveram confirmação pelo teste bacteriológico, revelando a presença da *B. abortus* biovar 1 em quatorze das amostras; uma amostra com a presença do biovar 2; uma do biovar 4 e outras cinco com o biovar 3.

O presente estudo tem o objetivo de demonstrar a ocorrência de animais negativos e de reagentes com base no teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), comparando-os com a ocorrência das lesões macroscópicas no pós-abate e resultados obtidos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Métodos

Foram coletadas 622 amostras de sangue e linfonodos em fêmeas bovinas com idade superior a 24 meses em matadouro-frigorífico sob Serviço de Inspeção Federal. O estabelecimento encontra-se localizado no município de Colíder, estado de Mato Grosso. Os animais, bem como as propriedades que participaram do experimento foram escolhidos aleatoriamente, entre propriedades foco e não foco,

contanto que houvesse abate de fêmeas. Os animais não demonstraram alterações clínicas na inspeção *ante-mortem*. Todos os bovinos tinham histórico de vacinação conforme declarado na Guia de Trânsito Animal (GTA).

As amostras de sangue foram coletadas na canaleta de sangria após insensibilização em tubos estéril com ativador de coágulo, resfriadas e encaminhadas para Embrapa Agrossilvipastoril em Sinop/MT. No laboratório de sanidade animal foram realizados os testes do AAT em todas as amostras de soro. Na linha de abate foram coletadas as amostras de linfonodos das linhas D, H e I (ilíacos, isquiático, retro mamário, pré-peitoral, mesentéricos). As amostras foram identificadas no que se refere à linha de inspeção e número de identificação individual dos animais. As amostras foram então congeladas à -20°C no túnel de congelamento e enviadas posteriormente para Embrapa Agrossilvipastoril. No laboratório, as amostras foram aliquotadas, incluindo a parte cortical e medular dos linfonodos, armazenadas em microtubos para posterior extração do DNA e realização do PCR. Foram coletadas as amostras de sangue e linfonodos até a obtenção de 80 amostras positivas pelo AAT, interrompendo-se então as coletas de ambos os materiais.

Associada à coleta de material para o diagnóstico laboratorial foi feita a inspeção em busca de lesões macroscópicas, seguindo a rotina do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do frigorífico. A inspeção incluiu toda a carcaça com ênfase nas articulações carpianas e tarsianas e nas vértebras torácicas e lombares na região da cernelha.

O teste do AAT foi realizado em todas as 622 amostras e interpretado de acordo com as normas descritas no PNCEBT. Brevemente, foram utilizados 30 µL de soro e 30 µL do antígeno para realização do teste, sendo considerado positivo quando houvesse formação de grumos. O antígeno utilizado foi fornecido pelo Lanagro/MG (Partida: 001/2012, Fab: 08/2012).

Para realização do PCR, a extração do DNA das amostras de linfonodo foi realizada de acordo com o método descrito por Leal-Klevezas et al. (1995). Previamente à separação da alíquota a ser avaliada, os linfonodos foram submetidos a toaleta, e posteriormente separado cerca de 1g por amostra. Em seqüência o material foi macerado, e separadas alíquotas de 500 µl de cada amostra para extração de DNA. Para a extração de DNA, foram adicionados 800 µL de TE (Tris-EDTA) pH 8,0 em cada amostra, sendo então homogeneizadas e posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e este processo repetido por mais duas vezes.

Após a primeira etapa, as amostras foram ressuspensas em 350 µL da solução A (5µL Tris-HCl 1M pH 8; 25 µL EDTA 0,5M pH 8; 10 µL NaCl 5M; 400 µL água MiliQ autoclavada) e,

posteriormente, homogeneizadas para acondicionamento em microtubos a 80°C por 10 minutos. No passo seguinte, foram adicionados 50 µL por amostra da solução B (50µL SDS 10%, 10µL Proteinase K), e mantidos a 37°C por 24 horas.

Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol, sendo então o material homogeneizado e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 400 µL do sobrenadante para um novo microtubo e adicionado igual volume de fenol-clorofórmio. Após nova centrifugação, foram transferidos 300 µL da fase aquosa para um novo microtubo e adicionados 300 µL de álcool isopropílico, sendo então homogeneizadas e mantidas por 18 horas a -20°C. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por mais 30 minutos, e o sobrenadante foi descartado, seguido de uma lavagem do material com 1 mL de etanol 70%, e em seguida novamente centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 30 µL TE pH 8,0. Após a extração as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da reação.

Para determinar a concentração e qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à leitura espectrofotométrica em Nanodrop (Thermo Scientific®) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para a amplificação dos fragmentos alvo, foram utilizados os seguintes componentes: 10,5 µL de água Mili-Q esterilizada; 0,5 µL de Taq; 1 µL de cada iniciador (*primer* B4 e B5), 4 µL DNTP; 2 µL tampão e 2 µL da amostra de DNA (250 a 600 ng de DNA). Os iniciadores utilizados foram: 5'TGGCTCGGTTGCCAATATCAA3' e 3'CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG5' (Sigma® – 001/8 de 2013) descrito por Baily et al. (1992), com peso molecular 223pb.

A temperatura utilizada para o anelamento foi de 64°C, sendo a melhor temperatura entre os testes de 60, 62, 64°C. Como controle positivo nas reações, utilizou-se DNA extraído da cepa de referência 2308 de *Brucella abortus* e água livre de nucleases como controle. Assim como os antígenos do AAT, o DNA também foi fornecido pelo LANAGRO/MG.

As análises dos produtos amplificados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1,8% (bcps31 e AMOS) e 3% (BruAb_0168), corados com SYBR Safe e visualizados em transluminador ultravioleta.

Após a obtenção de todos os resultados foi utilizado o teste *Kappa* para avaliar a concordância

entre as provas do AAT e PCR de acordo com Trusfield (1986). Para verificar se houve independência entre o resultado das duas provas, utilizou-se o teste qui-quadrado de McNemar, considerando os resultados como reagentes e não reagentes adotando-se o nível de significância de 5% (Jekel et al., 1999).

Resultados e Discussão

Das 622 amostras, apenas 142 matrizes eram provenientes de propriedades consideradas foco pelo Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA) com base nas Guias de Transporte Animal (GTA), 23% do total. Dos 89 animais reagentes ao AAT, 75 eram oriundos de propriedades consideradas como não foco com base na GTA das propriedades, apenas 14 matrizes eram provenientes de propriedades foco. Com base nos resultados do teste do AAT, foi encontrada uma frequência de 14,3% de animais reagentes. De acordo com a avaliação categórica, os municípios de Nova Canaã do Norte e Alta Floresta apresentam o maior número de casos da doença. O município de Novo Progresso/PA e Carlinda/MT vêm em seguida, com a segunda maior ocorrência de casos com base apenas no teste do AAT. Com base apenas nas 169 amostras avaliadas pelos dois testes, a ocorrência de casos cai em alguns municípios com base nos resultados do PCR, mas em Nova Canaã do Norte, a ocorrência continua sendo a mais elevada, apresentando uma ocorrência entre 19 a 24 casos.

Do total de animais analisados, apenas em dois foram encontradas lesões macroscópicas sugestivas de brucelose, ambos de propriedades negativas segundo as informações da GTA, representando 0,3% do total. Com base apenas no resultado das amostras das quais o DNA foi extraído, independentemente do resultado do AAT, segundo o teste de PCR a ocorrência de animais positivos seria de 36%.

Quando somados os resultados sorológico e molecular em uma estratégia de associação de testes em paralelo, a ocorrência de animais reagentes sobe de 14,3% para 18%, mesmo não tendo sido realizada a extração de DNA de todas as amostras para realização do PCR.

Do total de amostras coletadas, 169 foram analisadas por ambos os testes, sendo 34 consideradas positivas e 60 negativas tanto pelo método de PCR quanto pela sorologia. Os resultados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Comparação dos resultados com base nas provas sorológica (AAT) e molecular (PCR) para brucelose bovina

Testes	AAT positivo	AAT negativo	Total
PCR positivo	34	27	61
PCR negativo	48	60	108
Total	82	87	169

Das 22 propriedades incluídas no estudo, em apenas duas não foram encontrados animais reagentes com base no AAT, sendo uma delas considerada foco pelo INDEA. No entanto, nas duas propriedades foram encontrados animais reagentes com base nos resultados de PCR.

De acordo com os resultados, observou-se uma acurácia de 55,62% entre as provas, sendo $kappa$ igual a 0,1051 ($p < 0,05$), com intervalo de confiança variando de -0,081 a 0,291. Pelo teste de qui-quadrado de McNemar, a diferença entre os dois testes apresentou-se significativa ($p = 0,0203$), com χ^2 igual a 5,88. Sendo assim, há evidência suficiente para se recusar a hipótese nula, sendo então as proporções dos resultados significativamente diferentes umas das outras.

O diagnóstico é parte essencial de um programa sanitário. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico baseia-se nos sinais sugestivos da doença; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, em exames complementares diretos e indiretos⁶. O sucesso de um programa de controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. Os critérios adotados para a escolha de tais testes são: custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença (Chappel, 1989).

Entre as hipóteses previamente levantadas, havendo boa concordância entre o AAT e o PCR, os frigoríficos poderiam utilizar o teste de triagem para destinação de suas carcaças independentemente da avaliação no *post-mortem*, visto que o PCR tem sido utilizado como teste confirmatório nos casos onde ocorrem lesões visíveis durante a inspeção na linha de abate.

Os resultados indicam haver uma alta prevalência de animais positivos para brucelose oriundos de municípios localizados no norte de Mato Grosso, mesmo em propriedades consideradas livres da doença. Apesar de o diagnóstico sorológico ter identificado 14,3% de animais positivos, apenas 2 apresentaram sinais de lesão macroscópica caracterizando um quadro de bursite, embora seja este o critério para definir o destino das carcaças de acordo com as exigências do mercado externo como a Rússia por exemplo.

Embora seja o exame *post-mortem* a base para o diagnóstico macroscópico realizado por inspetores, estes associam as lesões inflamatórias à ocorrência de brucelose, caracterizadas como inflamações da bursite cervical localizadas na região da cruz e adjacências (Langenegger et al., 1975; Almeida et al., 2000), os resultados encontrados no presente trabalho sugerem ser este tipo de exame insuficiente para o embasamento dos agentes do serviço de inspeção. A frequência de lesões encontradas (0,3%) reforça o resultado encontrado

por Viana et al. (2010), onde dos 845 animais avaliados, com uma prevalência de 16,6% e 17,2% nos estados do Pará e Tocantins, nenhum dos animais apresentou sinais sugestivos de brucelose no exame *ante* e *post-mortem*.

Com base nos 2 animais com diagnóstico macroscópico positivo, o presente trabalho aponta que o diagnóstico clínico da brucelose em matadouro tem reduzida eficácia para o critério seguro para julgamento sanitário por permitir a liberação para consumo direto ou exportação, embora ambos os animais foram considerados positivos pela técnica de AAT e PCR.

No Brasil, a brucelose bovina ocorre endemicamente em todo o território nacional, independentemente do sistema de produção e/ou criação e exploração econômica. Segundo Negreiros et al. (2009), no MT a prevalência geral de focos e de animais infectados foi de 41,2% e 10,2%, respectivamente. Com relação ao circuito pecuário 4, no qual se localiza o município de Colíder, foco deste estudo, a prevalência animal foi de 15,3% e de rebanho de 50,3%. Os fatores de risco encontrados demonstram haver uma *Odds Ratio* de 6,8% quando se tem um número de fêmeas no rebanho acima de 51 animais. Embora o presente trabalho não tenha estudado a prevalência dos rebanhos devido ao número amostral, a ocorrência de animais positivos está de acordo com a prevalência descrita por Negreiros et al. (2009). Foram encontrados 14,3% de animais reagentes com base no AAT, muito próximo do resultado de 15,3% de prevalência animal descrita pelos autores. Já com relação às propriedades, em 91% foi encontrado pelo menos 1 animal positivo com base no teste do AAT ou no teste PCR.

Ainda em relação ao trabalho de Negreiros et al. (2009), a presença de fêmeas no rebanho como fator de risco parece ser um importante fator para ocorrência da doença, já que a maior parte das fazendas estudadas têm o sistema de cria como uma das atividades da pecuária bovina, condizendo com o alto número de rebanhos positivos e animais reagentes. Devido às dificuldades encontradas pelo segmento, somente no ano de 2013, 2 milhões de fêmeas foram abatidas no estado até o mês de agosto, um crescimento de 73% quando comparado ao total do exercício de 2010 (Acrimat, 2013). De acordo com essa pesquisa realizada no estado de Mato Grosso, 84% dos produtores do estado estão envolvidos com a atividade de cria, seja ela como a única atividade ou quando é realizado o ciclo completo.

Como citado por Dias (2004), a compra e o trânsito de animais destinados à reprodução são fatores de risco para introdução da brucelose nos rebanhos. A implementação e manutenção de um sistema de vigilância das doenças infecciosas, bem como a rastreabilidade da informação nas cadeias produtivas demandam o uso de sistemas para o seu desenvolvimento, sem os quais não é possível a

construção de formas de rastreabilidade eficazes e úteis para atender as regulamentações cada vez mais exigentes (Murakami & Saraiva, 2005). Fica clara a importância da busca ativa de casos como política de saúde animal em um sistema de vigilância epidemiológica de agravos transmissíveis, incluindo zoonoses importantes como a brucelose. No entanto, como já discutido anteriormente, apenas a identificação de lesões sugestivas não é suficiente para o sistema de vigilância no estado.

É inegável que os testes sorológicos constituem a base do diagnóstico em um programa sanitário para controle ou erradicação da brucelose animal, sendo a principal alternativa para viabilizar o teste em um grande número de amostras. No entanto, deve ser considerado que o diagnóstico sorológico está sujeito a erros. A associação de testes é uma alternativa em alguns casos para incrementar a sensibilidade ou especificidade dos testes, havendo estratégias para cada necessidade.

Os resultados com base nas análises estatísticas demonstram que há concordância de resultados acima do que é devido ao acaso (>0) entre os testes AAT e PCR, porém o valor de *Kappa* foi considerado baixo ($Kappa=0,1051$). O mesmo ocorreu com o trabalho de Costa et al. (2012), onde a concordância foi baixa entre os testes de PCR e imunodifusão (IDGA). Entretanto, a técnica de PCR pode ser uma alternativa interessante para ser aplicada em paralelo a sorologia, aumentando a identificação de animais falsos negativos nos rebanhos, reduzindo assim, a contaminação entre animais.

Estes resultados indicam que nem a sorologia nem o PCR são métodos de diagnósticos completamente confiáveis para identificação de indivíduos positivos (Costa et al., 2011). Para contornar esse problema, o PNCEBT prevê a repetição periódica dos testes até o completo saneamento do rebanho (Brasil, 2006). Ilhan et al. (2008) enfatizaram a importância de utilizar mais de uma técnica laboratorial para detecção de animais positivos para brucelose, especialmente quando há um propósito epidemiológico em questão.

A maior parte dos testes baseados na formação de complexo antígeno-anticorpo é sensível à temperatura e diferentes condições de trabalho, podendo afetar a interpretação dos resultados (Dohoo et al., 2003). Além disso, testes sorológicos têm sua especificidade reduzida em regiões onde a doença é endêmica (Morata et al., 2003), sendo esta a realidade brasileira como já discutido anteriormente. Outra observação diz respeito à característica deste estudo, no qual foram incluídos animais naturalmente infectados. Dessa forma, foram avaliados animais em diferentes estágios da infecção (latente, incubação e forma crônica), além de variação de idade, estado reprodutivo e status imune.

O método de PCR, apesar da alta sensibilidade e especificidade, também pode

apresentar resultados falsos positivos (Baily et al., 1992) ou falsos negativos. O protocolo de extração de DNA, o tipo de amostra clínica, e limites de detecção para cada um dos protocolos, são fatores que podem influenciar a eficácia da técnica (Morata et al., 2003; Navarro et al., 2004; Mitka et al., 2007). Foram utilizados os linfonodos das linhas D ou H, dependendo da disponibilidade de material para extração. Não foi realizado um *pool* das amostras, pois em alguns casos, as identificações nos sacos plásticos utilizados para coleta foram perdidas durante o armazenamento. Sendo assim, apenas um dos linfonodos foi incluído no processo de alíquotagem e processamento. Leary et al. (2006) avaliaram a viabilidade do uso do PCR convencional e em tempo real para diagnóstico da brucelose, analisando amostras de sangue, leite, e linfonodos das vacas sorologicamente positivas. Os autores concluíram que os linfonodos são o melhor material para o diagnóstico pelo método molecular.

Conclusão

O presente trabalho aponta que o diagnóstico clínico da brucelose em matadouro tem reduzida eficácia para o critério seguro para julgamento sanitário por permitir a liberação para consumo direto ou exportação.

A vigilância epidemiológica da Brucelose no estado de Mato Grosso é baseada na busca passiva de casos, restringindo a abertura de focos à notificação de animais reagentes pelos veterinários credenciados pelo PNCEBT. A busca ativa de focos pelos órgãos de defesa a saúde animal é essencial para identificação de propriedades onde a doença ocorre no estado. Como descrito acima, a ocorrência da brucelose é alta no norte de MT e Sul do PA. Novos estudos envolvendo o estudo epidemiológico da brucelose bovina devem ser realizados na região.

A concordância entre os testes do AAT e PCR não se dá ao acaso, porém é baixa de acordo com o teste de *Kappa*. Os testes podem ser associados paralelamente para identificação de animais reagentes em programas de controle onde está previsto o controle e a erradicação da doença, sendo uma estratégia interessante em regiões onde a doença é endêmica.

Agradecimentos: Ao Pesquisador Luciano Bastos Lopes e pela orientação na pesquisa; aos colegas Valéria Spyridion Mustacas, Camila Eckstein, Hugo Ponce e Adalgisa Thayne pela valiosa ajuda na execução deste trabalho; ao LANAGRO/MG e membros de sua equipe pela colaboração no fornecimento de antígenos.

Referências

ACRIMAT. Criadores de Mato Grosso denunciam baixa rentabilidade do segmento da cria. 2013. <http://pecuaria.ruralbr.com.br/noticia/2013/10/criador>

es-de-mato-grosso-denunciam-baixa-rentabilidade-do-segundo-da-cria-4287125.html.

ALMEIDA, LP.; REIS, DO.; GERMANO, PML. Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob inspeção federal. *Ciência Rural* 30:287-291, 2000.

BAILY, GG.; KRAHN, JB.; DRASAR, BS.; STOKER, NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine Hygiene* 95:271-275, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Manual Técnico, Brasília: MAPA. 2006;188p.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. *Surveillance* 16:3-5, 1989.

COSTA, IC.; MESQUITA, AJ.; LINHARES, GFC.; FREITAS, MR. Emprego da reação em cadeia da polimerase, ELISA, soroglutinação rápida e cultivo microbiológico na elucidação da etiologia da bursite cervical. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 8:155-159, 2011.

COSTA, EA.; SANT'ANA, FM.; CARVALHO, CJS.; MOUSTACAS, VS.; SILVA, SMMS.; PAIXÃO, TA.; SANTOS, RL. Diagnosis of *brucella ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64:751-754, 2012.

DIAS, R.A. Caracterização espacial da brucelose bovina no estado de São Paulo. 111p. (Tese de Doutorado)- USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, 2004.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Analysis of survey data. In: *Veterinary Epidemiologic Research*, AVC Inc., Charlottetown p.35-42, 2003.

ILHAN, Z.; AKSAKAL, A.; EKIN, IH.; GÜLHAN, T.; SOLMAZ, H.; ERDENLIG, S. Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Letters in Applied Microbiology* 46:301-306, 2008.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva*. Ed. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, 328 p., 1999.

LAGE, AP.; POESTER, FP.; PAIXÃO, TA.; SILVA, TMA.; XAVIER, MN.; MINHARRO, S.; MIRANDA,

KL.; ALVES, CM.; MOL, JPS.; SANTOS, RL. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 32: 202-212, 2008.

LANGENEGGER, J.; SECCHIN, H.; BAPTISTA, AM. Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 10:45-49, 1975.

LEAL-KLEVEZAS, DS.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, IO.; LOPEZ-MERINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, JP. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals. *Journal Clinical Microbiology* 33:3087-3090, 1995.

LEARY, OS.; SHEAHAN, M.; SWEENEY, T. *Brucella abortus* by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science* 81:170-176, 2006.

MITKA, S.; ANETAKIS, C.; SOULIOU, E.; DIZA, E.; KANSOUZIDOU, A. Evaluation of different PCR assays for the early detection of acute and relapsing human brucellosis in comparison with conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology* 45:1211-1218, 2007.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, MI.; REGUERA, JM.; GARCÍA-ORDOÑEZ, MA.; CÁRDENAS, A.; COLMENERO, JD. Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology* 41:144-148, 2003.

MURAKAMI, E.; SARAIVA, AM. Rastreabilidade da informação nas cadeias produtivas: padrões de troca de dados. *Revista Brasileira de Agroinformação* 7:58-66, 2005.

NAVARRO, E.; CASAO, MA.; SOLEIRA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 4:115-123, 2004.

NEGREIROS, RL.; DIAS, RA.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, JS.; GONÇALVES, VSP.; SILVA, MCP.; FIGUEIREDO, VCF.; LÔBO, JF.; FREITAS, J.; AMAKI, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61:56-65, 2009.

PAULIN, LM.; FERREIRA NETO, JS. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo* 69:105-112, 2002.

PAULIN, LM.; FERREIRA NETO, JS. O Combate à brucelose Bovina: situação brasileira. Jaboticabal: Funep, 154p, 2003.

POESTER, FP.; FIGUEIREDO, VCF.; LÔBO, JR.; GONÇALVES, VSP.; LAGE, AP.; ROXO, E.; MOTA, PMPC.; MULLER, EE.; FERREIRA NETO, JS. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose Bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 61:1-5, 2009.

POESTER, FP.; GONÇALVES, VSP.; LAGE, AP. Brucellosis in Brazil. Veterinary Microbiology 90: 55-62, 2002.

SANTOS RL.; MARTINS, TM.; BORGES, AM.; PAIXÃO, TA. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira 33: 759-764, 2013.

SILVA JÚNIOR, F.F. Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigoríficos pela sorologia, bacteriologia e PCR. 64p. (Tese de doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SOLA, M.C. Emprego da técnica de PCR em tempo real na detecção de DNA de *Brucella spp* em lesões de carcaças e vísceras provenientes de matadouros frigoríficos sob Inspeção Federal. 76p. (Dissertação de mestrado)- Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, GO, 2011.

TRUSFIELD, M. Veterinary Epidemiology. London: Butterworth, 273p., 1986.

VIANA, L.; BAPTISTA, F.; TELES, J.; RIBEIRO, APC.; PIGATTO, CP. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo 77:517-520, 2010.