



## BRUCELOSE BOVINA: REVISÃO

Marília Cristina Sola<sup>1\*</sup>, Fernanda Antunha de Freitas<sup>1</sup>, Ervaldo Lourenço de Sousa Sena<sup>2</sup>, Albenones José de Mesquita<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>2</sup>Biomédico, Gerente do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia, Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>3</sup>Doutor, Professor adjunto na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

\*mcsmarilia@gmail.com

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

### RESUMO

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do gênero *Brucella*, que acomete o homem e diferentes espécies animais. Nos bovinos, esta enfermidade é provocada pela bactéria *Brucella abortus* que compromete especialmente o sistema reprodutivo, caracterizando-se, principalmente pela ocorrência de abortos no terço final da gestação. Apesar da implementação de programas que visam o controle e a erradicação da enfermidade, apresenta-se endêmica em muitos países, principalmente aqueles em desenvolvimento, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção e sérias implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico. A doença pode ser transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados e anexos fetais e, ainda, veiculada ao homem pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e seus derivados que não passaram por processamento térmico. Pode ser veiculada também por meio de carnes cruas e pela própria manipulação de carcaças e vísceras durante o abate sanitário. Os programas de controle e erradicação de uma enfermidade são estruturados principalmente na interrupção da cadeia de transmissão do agente através da eliminação de indivíduos infectados e no aumento do número de indivíduos resistentes na população, sendo a vacinação uma poderosa estratégia de controle.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Brucella spp.*, patógeno, zoonose.

### BOVINE BRUCELLOSIS: REVIEW

#### ABSTRACT

Brucellosis is a chronic infectious disease caused by bacterium of the genus *Brucella*, which affects humans and different species of animals. In cattle, this disease is caused by the bacterium *Brucella abortus* that compromises especially the reproductive system, characterized mainly by the occurrence of abortions in the last third of gestation. Despite the implementation of programs aimed at the disease controlling and eradicating, brucellosis is endemic in many countries, especially in developing ones, resulting in significant economic losses and serious implications for

animal and public health, due to its zoonotic character. The disease can be transmitted by direct or indirect contact with infected animals, fetal membranes, and also transmitted to humans by contaminated animal products, especially milk and dairy products that have not undergone thermal processing, by raw meat and the handling of carcasses and viscera at the slaughterhouse. Programs for control and eradication of a disease are mainly structured in interrupting the chain of transmission of the agent through the elimination of infected individuals and the increasing number of resistant individuals in the population, with vaccination a powerful control strategy.

**KEYWORDS:** *Brucella* spp , pathogenic microorganism, zoonotic disease.

## INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira apresenta-se como um dos grandes esteios da economia do país. Possui um rebanho de aproximadamente 209 milhões de cabeças e revela avanços nos índices de produção, com destaque para a produtividade e para a exportação de seus produtos (IBGE, 2014).

Em termos de comercialização, o Brasil atende as expectativas de demanda e sanidade, e ocupa posição estratégica entre os grandes fornecedores mundiais. No ano de 2013, as exportações brasileiras de carne bovina *in natura* e industrializadas somaram em torno 1,5 milhões de toneladas que foram comercializadas em cerca de 200 países nos cinco continentes (ABIEC, 2014).

No entanto, ao mesmo tempo em que o Brasil busca aumentar ainda mais seus índices de produtividade, sente a necessidade de melhorar a qualidade de seus produtos, principalmente a sanitária. A rastreabilidade e os programas voltados para a sanidade animal, envolvendo o controle e erradicação de doenças através de vacinações, tratamentos e profilaxia, são requisitos fundamentais para que o país possa manter-se como exportador e, principalmente, expandir a competitividade no mercado (UFLA, 2012).

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*. Apresenta-se na forma endêmica em muitos países, resultando em prejuízos econômicos significativos aos sistemas de produção e sérias implicações em saúde animal e pública, visto seu caráter zoonótico (BRASIL, 2006)

A ocorrência de brucelose bovina em um país ou região pode resultar em perdas econômicas significativas como a imposição de barreiras sanitárias e tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal. Provoca perdas no rendimento industrial com a condenação do leite e da carne oriundos de animais infectados, gastos significativos devidos aos altos custos para a implementação dos programas de controle e erradicação da doença, além de prejuízos envolvendo a produção animal, devido ao elevado número de abortos, nascimento de bezerros fracos, baixa fertilidade nas propriedades rurais e principalmente o declínio na produção de leite e carne (POESTER et al., 2009).

A brucelose pode ser veiculada ao homem pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, principalmente leite e derivados que não passaram por processamento térmico e transmitida pelo contato direto ou indireto com animais infectados, fetos abortados ou anexos fetais, além da própria manipulação de carcaças e vísceras no abate sanitário. As principais manifestações clínicas são as febres recorrentes, fraquezas, dores musculares, distúrbios nervosos e sudorese, o que acaba por levar à incapacidade parcial ou total ao trabalho (PAULIN & FERREIRA NETO, 2008).

Visando o controle da brucelose bovina, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001 no Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) que consiste em um conjunto de medidas sanitárias buscando uma importante redução na prevalência e na incidência da brucelose e tuberculose. Dentre as medidas, destacam-se a vacinação obrigatória de fêmeas, com idade entre três e oito meses e a certificação de propriedades livres ou monitoradas para as doenças. São esperados benefícios sanitários e econômicos com a redução dos prejuízos ocasionados pelas doenças, aumento na competitividade da pecuária nacional, diminuição do impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal e maior credibilidade sanitária dos produtos de origem animal (BRASIL, 2006).

O diagnóstico de uma enfermidade é fundamental para se estabelecer a ocorrência, distribuição e caracterização do agente. Nesse contexto, a brucelose animal pode ser diagnosticada por meio de diferentes métodos, de forma isolada ou em conjunto. O diagnóstico clínico baseia-se na presença de sinais como aborto, nascimento de bezerros fracos, retenção de placenta e esterilidade de machos e fêmeas. O epidemiológico, no histórico dos rebanhos nas propriedades e o laboratorial, no isolamento e identificação do agente etiológico, na detecção do DNA dos microrganismos, e na presença de anticorpos nos fluidos orgânicos (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

Na rotina de inspeção sanitária da carne, os médicos veterinários não possuem meios de diagnósticos específicos que os permitem associar as alterações observadas durante a inspeção sanitária *post-mortem* com a infecção brucélica. Este desafio conduz a busca de alternativas que possam proporcionar segurança e rapidez no diagnóstico das diversas lesões identificadas no decorrer das atividades de inspeção nos estabelecimentos de abate.

Neste contexto, objetivou-se realizar uma revisão de literatura sobre a brucelose bovina, considerando as características do patógeno, manifestações clínicas nos animais e homem, formas de diagnóstico e controle da enfermidade.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Conceito e histórico

A brucelose bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella*, principalmente pela *Brucella abortus*. Caracteriza-se por ser um problema grave ligado à saúde pública, causar elevados prejuízos econômicos e ser uma zoonose de distribuição mundial (BRASIL, 2006).

A brucelose foi descrita no homem, pela primeira vez, por Marston em 1859, a partir de casos de febre ondulante seguidos de morte, ocorridos na Ilha de Malta, no Mar Mediterrâneo, sendo por isso denominada Febre de Malta (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

Em 1887, Sir David Bruce, médico inglês, isolou pela primeira vez uma bactéria do baço de soldados britânicos, mortos na Ilha de Malta, denominando-a como *Micrococcus melitensis* (VIEIRA, 2004; GODFROID et al., 2005; POESTER et al., 2009).

Bernhard Bang, um patologista veterinário dinamarquês, isolou em 1895, um microrganismo do útero e membranas fetais resultantes do aborto de vacas, identificando-o como *Bacillus abortus* (NICOLETTI, 2002; POESTER et al., 2009).

Em 1913, Gonçalves Carneiro relatou o primeiro caso de brucelose humana no Brasil e, no ano seguinte, Danton Seixas realizou pela primeira vez no país, o diagnóstico clínico da brucelose bovina, no estado do Rio Grande do Sul (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; VIEIRA, 2004).

Nos EUA, Alice Evans, em 1918, demonstrou que as bactérias isoladas por Bruce e Bang apresentavam similaridades morfológicas, imunológicas e de cultivo. Em razão disto, Meyer e Shaw em 1920, propuseram a criação do Gênero *Brucella*, em homenagem ao autor do primeiro isolamento do agente, além da designação dos dois microrganismos por *Brucella melitensis* e *Brucella abortus*, respectivamente (CORRÊA & CORRÊA, 1992; VIEIRA, 2004; RIBEIRO et al., 2008).

Jacob Traum, em 1914, isolou a partir de fetos abortados de suínos, um microrganismo similar aos agentes descritos por Bruce e Bang, sendo confundida a princípio, como a causadora dos abortos nos bovinos. Posteriormente, foram verificadas as diferenças entre os isolados, em função de algumas propriedades de cultivo, bioquímicas e antigênicas, incluindo o agente em outra espécie denominada *Brucella suis* (HUDDLESON, 1931). A partir de então, outras espécies foram acrescentadas ao gênero, seguindo-se: *Brucella ovis* (ovinos) (BUDDLE, 1956), *Brucella neotomae* (roedores silvestres) (STOENNER & LACKMAN, 1957), *Brucella canis* (canídeos) (CARMICHAEL & BRUNER, 1968), *Brucella pinnipedialis* (focas e golfinhos) (FOSTER et al., 2007), *Brucella ceti* (baleias) (FOSTER et al., 2007), *Brucella microti* (isoladas de roedores silvestre) (SCHOLZ et al., 2008) e *Brucella inopinata* (isolada em humanos) (SCHOLZ et al. 2010).

### Características do agente

As bactérias do gênero *Brucella* pertencem à classe *Proteobacteria*, são Gram-negativas, intracelulares facultativas, imóveis e não esporuladas. Apresentam-se na forma de bastonetes curtos que medem de 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão (VELASCO et al., 2000; REDKAR et al., 2001; PROBERT et al., 2004). São considerados microrganismos aeróbios, porém uma atmosfera com tensão de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> favorece o isolamento de algumas espécies. Apresentam temperatura de multiplicação na faixa de 20 a 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal, e um pH ótimo de 6.6 a 7.4 (PAJUABA, 2006; OIE, 2009).

Dentro deste gênero são descritas dez espécies independentes, classificadas principalmente por diferenças de patogenicidade, preferência de hospedeiro, características bioquímicas e antigênicas. As espécies de *Brucella* e seus biovares são diferenciadas por meio de testes como a sorotipagem, tipificação de fagos, requerimentos de CO<sub>2</sub>, sensibilidade a corantes, produção de H<sub>2</sub>S, além das propriedades metabólicas (ALTON et al., 1988; PAJUABA, 2006; OIE, 2009).

As principais espécies do gênero são a *B. melitensis* (isoladas em cabras, ovelhas e camelos), *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. suis* (suínos e javalis), *B. neotomae* (ratos do deserto), *B. ovis* (ovelhas) e *B. canis* (cães), as quais são subdivididas em sete biovares ou biotipos para *B. abortus* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), três para *B. melitensis* (1, 2 e 3) e cinco para *B. suis* (1, 2, 3, 4 e 5) (MORENO et al., 2002; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008).

As outras espécies como *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, isoladas em mamíferos marinhos (focas, leões marinhos, golfinhos e baleias) e *B. microti* (procedente de ratazanas selvagens) não foram diferenciadas em biovares, apesar de existirem variantes dentro das cepas (CLOECKAERT et al., 2001; SCHOLZ et al., 2008).

Classicamente, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser divididas em dois

grupos antigenicamente distintos, denominadas lisas ou rugosas, com base nas características de multiplicação em meios de cultura no cultivo primário e na constituição química da parede celular - presença ou ausência da cadeia O - um dos componentes do lipopolissacáride (LPS) localizado na superfície externa da *Brucella* spp e que possui relação com a virulência de algumas espécies (NIELSEN et al. 2004; CARDOSO et al., 2006).

As colônias lisas possuem como constituinte do LPS, o lipídeo A, o núcleo oligossacáride e a cadeia O. Já as rugosas, possuem como constituinte da membrana externa apenas o lipídeo A e o núcleo oligossacáride (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

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

A *Brucella* spp apresenta-se exigente quanto à multiplicação *in vitro*, porém possui uma ampla capacidade de sobrevivência em ambientes que apresentam condições de umidade, abrigo de luz solar direta, pH neutro, temperatura e matéria orgânica, podendo resistir em pastagens, fetos abortados, anexos fetais e fezes úmidas por longos períodos (CARVALHO et al., 1995; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006; OIE, 2009).

Todas as espécies do gênero são sensíveis ao calor e à acidez, e quando submetidas à ação de desinfetantes comuns, como soluções de formaldeídos a 2%, produtos clorados (2,5% de cloro ativo), compostos fenólicos a 2,5% e permanganato de potássio (1:5000), a eliminação de *Brucella* spp ocorre em, no máximo, 15 minutos. O álcool a 70% destrói imediatamente as bactérias enquanto o carbonato de cálcio (1:10) as elimina em 30 minutos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; OIE, 2009).

A sobrevivência de *Brucella* spp no leite e produtos lácteos depende da temperatura, pH e da presença de outros microrganismos que possam inibir a multiplicação, podendo permanecer no alimento de 15 a 90 dias. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a viabilidade é mantida mesmo em temperatura de congelamento. No entanto, a fervura, processos de pasteurização e os métodos de esterilização são eficazes na eliminação do microrganismo (CARVALHO et al., 1995; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

Em carnes, a *Brucella* spp pode 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 et al., 2003).

Os casos de brucelose por ingestão de carne ou derivados são raros, visto o número reduzido de bactérias no músculo e o raro consumo de carne crua. Já o consumo de sangue e medula óssea pode ser considerado veículo de transmissão da doença. A sobrevivência da *Brucella* spp em carnes depende do grau de contaminação no início do processo e do tipo de tratamento tecnológico empregado. Essas bactérias podem persistir nas células do sistema monocítico fagocitário, nas secreções uterinas, na glândula mamária e na medula óssea. Por isso, o descarte dos tecidos que concentram um grande número de bactérias pode diminuir ou até mesmo evitar a contaminação de carcaças e vísceras durante o abate (CARVALHO et al., 1995; PESSEGUEIRO et al., 2003; PARDI et al., 2006).

## **Epidemiologia**

A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses. Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, continua re-emergente e se apresentando como um grave problema sanitário e econômico, principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia (CORBEL, 1997; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; OIE, 2009).

No Brasil, a brucelose é endêmica, porém apresenta dados bastante diferenciados face à dimensão territorial e às características próprias de cada região (POESTER et al., 2002; RIBEIRO et al., 2008; LAGE et al., 2008).

De acordo com o estudo epidemiológico nacional realizado em 1975, a brucelose bovina encontrava-se disseminada por todo o território brasileiro. As prevalências estimadas por regiões foram: Norte, 4,1%; Nordeste, 2,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Sudeste, 7,5% e Sul, 4%. Posteriormente, outros inquéritos sorológicos, por amostragem, foram realizados por alguns estados, porém não foram evidenciadas grandes alterações em relação aos índices verificados em 1975. Os dados de notificações oficiais no período de 1988 a 1998 indicaram que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% (POESTER et al., 2002; BRASIL, 2006).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), que consiste em um conjunto de medidas sanitárias estratégicas em busca da redução da prevalência e incidência da brucelose, implementando a vacinação compulsória de bezerras com idade entre três e oito meses, em todo o país. Dentre outras atividades previstas no programa destacam-se a adesão voluntária dos criadores na busca de rebanhos livres e monitorados, a prática de testes sorológicos regulares em rebanhos de elite para a participação em feiras e exposições e o sacrifício dos animais positivos para brucelose (BRASIL, 2006).

Após a implementação do PNCEBT, foram realizados inquéritos soropidemiológicos no período de 2001 a 2004 em 13 unidades federativas (BA, DF, ES, GO, MG, MT, PR, RJ, RS, SC, SE, SP e TO) a fim de conhecer a situação epidemiológica da doença no início do programa de controle, baseando-se na frequência e distribuição da enfermidade na população.

Os resultados revelaram que a brucelose encontra-se disseminada nas diversas áreas estudadas e a situação encontra-se heterogênea entre os diversos estados brasileiros e, até mesmo, entre regiões de um mesmo estado. Evidenciou-se também uma tendência de aumento da prevalência da brucelose no sentido Centro-Oeste/Norte do país, principalmente nos estados tradicionais produtores de carne (POESTER et al., 2009).

## **Patogenia e sinais clínicos**

A patogenicidade das bactérias do gênero *Brucella* está intimamente relacionada com os mecanismos que permitem sua invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular nas células do hospedeiro, mantendo-as protegidas da ação do sistema imune (ARÉSTEGUI et al., 2001; NIELSEN et al., 2004; XAVIER et al., 2009).

A infecção natural se inicia principalmente pelas mucosas oral, nasofaríngea, conjuntival ou por solução de continuidade da pele, sendo que a porta de entrada

principal da *B. abortus* em bovinos é a mucosa orofaríngea (BISHOP et al., 1994; GORVEL & MORENO, 2002; CAMPANÃ et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008).

Após a penetração na mucosa, as bactérias são fagocitadas principalmente por macrófagos, sendo carreadas até os linfonodos regionais, onde se multiplicam e podem permanecer por semanas a meses, levando à hiperplasia e linfadenite (BISHOP et al., 1994; LAGE et al., 2008; NETA et al., 2009).

A partir dos linfonodos regionais, os microrganismos podem disseminar livremente ou no interior de macrófagos, pela via hemática e linfática albergando-se em outros linfonodos, principalmente os supramamários, e em órgãos como baço, fígado e outros tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver nestes locais por longos períodos, escapando da resposta imune (HARMON et al., 1988; GORVET & MORENO, 2002; CAMPANÃ et al., 2003; LAGE et al., 2008; LIRA, 2008; MATRONE et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

O mecanismo de permanência da *Brucella* spp no interior de células de defesa está relacionado à síntese de enzimas antioxidantes e à produção de guanosina 5' monofosfato-GMP e adenina que atuam inibindo a fusão do lisossomo com o fagossomo impedindo assim a degranulação dos macrófagos durante a fagocitose e, conseqüentemente, a destruição do agente (ARESTÉGUI et al., 2001; BALDWIN & PARENT, 2002; NETA et al., 2009).

Durante a fase de multiplicação celular, estas bactérias podem provocar alterações inflamatórias e anatomopatológicas caracterizadas por granulomas difusos, levando à hiperplasia linfóide, esplenomegalia e até hepatomegalia (BISHOP et al., 1994; LAGE et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; MATRONE et al., 2009). Porém, de acordo com CORRÊA & CORRÊA (1992), nem todos os órgãos e tecidos invadidos por microrganismos do gênero *Brucella* apresentam alterações evidentes e áreas de necrose.

De acordo com CORRÊA & CORRÊA (1992), os órgãos e tecidos invadidos por microrganismos do gênero *Brucella* podem apresentar uma aparência normal ou áreas com necrose. A presença de *Brucella* spp em tecidos pode provocar a formação de resposta inflamatória com modulação de macrófagos em células epitelióides, infiltração por plasmócitos e linfócitos, podendo assim ocorrer focos de necrose no centro das lesões e o desenvolvimento de cápsulas ao redor das áreas lesionadas devido à proliferação de tecido conjuntivo, porém, a formação de um granuloma depende da resistência natural do organismo, da resistência adquirida e principalmente do número e grau de patogenicidade do agente infectante.

Os órgãos de predileção do gênero *Brucella* são aqueles que oferecem elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol - álcool polihídrico de quatro carbonos - presente no útero grávidico, tecidos mamários, ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino, sendo importante ressaltar que humanos, equinos, coelhos e roedores possuem ausência ou baixa produção do eritritol, fato este que justificaria o reduzido impacto da brucelose no aparelho reprodutivo nestas espécies (CARTER & CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

A infecção do útero gestante ocorre por via hematogênica e as alterações variam de acordo com a intensidade da infecção e o tempo de gestação. A afinidade das brucelas pelos trofoblastos parece estar relacionada à presença de elevadas concentrações de eritritol e progesterona na placenta (SILVA et al., 2005).

Nos bovinos, a concentração de eritritol se altera de forma gradativa conforme o período gestacional, atingindo níveis máximos próximo ao parto,

aumentando assim a capacidade de infecção e multiplicação dos microrganismos (CARTER & CHENGAPPA, 1991; LAGE et al., 2008). A evolução do processo inflamatório leva a lesões necrótico-inflamatórias na placenta além de lise das vilosidades, resultando no descolamento dos cotilédones; prejuízo na circulação materno-fetal, dificultando e até mesmo impossibilitando a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, provocando assim danos que variam de nascimento de bezerros subdesenvolvidos ao aborto (BISHOP et al., 1994; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

Devido ao desenvolvimento da imunidade celular do animal após o primeiro aborto, há uma diminuição significativa do número e tamanho das lesões nos placentomas nas gestações subsequentes. Diante disso, os abortos tornam-se infrequentes, levando ao aparecimento de outras manifestações da enfermidade como a retenção de placenta, natimortalidade ou o nascimento de bezerros fracos, além de quadros de metrite ou endometrite crônica e conseqüentemente subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

Os machos podem apresentar aumento do volume dos testículos de forma uni ou bilateral, além dos epidídimos, ampolas e vesículas seminais. Devido à reação inflamatória do tipo necrosante, pode haver atrofia do órgão afetado, levando a quadros de subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (GORVEL & MORENO, 2002; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; NOZAKI, 2008).

No aparelho locomotor, os microrganismos do gênero *Brucella*, principalmente a *B. abortus* localiza-se na bursa, tendões, músculos e articulações, causando artrites, principalmente nas articulações carpianas e tarsianas; espondilites e bursites, especialmente nas vértebras torácicas e lombares, podendo atingir a medula óssea e bainha dos tendões, sendo o achado clínico clássico, o abscesso fistulado ou não na região da cernelha, lesão conhecida como “mal da cernelha” ou “mal das cruces”, que acomete principalmente os equinos (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; RADOSTITIS et al., 2007).

Os inchaços nas articulações dos joelhos e jarretes, conhecidos como higromas, também apresentam evidência de brucelose (RADOSTITIS et al., 2007; LAGE et al., 2008).

VERONESI (1991) considera como lesões sugestivas de brucelose em bovinos as alterações denominadas bursites, higroma articular e orquite. As bursites cervicais são lesões inflamatórias de origem hematogênica, caracterizadas como bolsas serosas localizadas na região da cruz, adjacentes à porção funicular do ligamento cervical e apófises espinhosas cervicais.

Muitos autores associam a presença de bursite à infecção brucélica, visto a frequência de isolamento e detecção do agente em muitos casos, além da detecção de títulos de anticorpos aglutinantes compatíveis com a doença (PARDI et al., 1956; LANGENEGGER et al., 1975; JUBB et al., 1993; RIBEIRO et al., 2003; FREITAS & OLIVEIRA, 2005; PARDI et al., 2006; VIANA et al., 2010). Porém, em muitos relatos a ação parasitária principalmente pelo gênero *Onchocerca* é uma das causas que predispõe a formação das bursites cervicais não só como causa primária, mas, principalmente, como fator desencadeante de processos inflamatórios graves por infecção secundária (ALMEIDA et al., 2000; COSTA et al., 2001).



### Mecanismos de transmissão

A principal via de infecção de *Brucella* spp no organismo é a oral, além do trato respiratório, conjuntivas, pele e trato genital (ACHA & SZYFRES, 2001).

Os animais contaminados transmitem as bactérias do gênero *Brucella* através do parto ou aborto, valendo destacar que as fêmeas após abortarem pela primeira vez, tornam-se portadoras crônicas, eliminando *Brucella* spp no leite, urina e descargas uterinas durante os partos subsequentes, abortando ou não (PACHECO, 2007; MIYASHIRO, 2004). A partir da terceira gestação após a infecção, os abortos não ocorrem, devido à imunidade celular e a redução de necrose dos placentomas, permitindo assim o nascimento dos bezerros (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A enorme quantidade de microrganismos eliminados durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à ampla resistência do agente no ambiente pode ser caracterizada como a principal fonte de infecção para os animais suscetíveis. Há um favorecimento da transmissão de brucelose pelo próprio hábito dos bovinos de lambar e cheirar as crias ou fetos abortados por outros animais (NICOLLETTI, 2002; SILVA et al., 2005; MINHARRO, 2009).

A participação dos machos na transmissão da brucelose pela monta natural é pequena não se caracterizando como a forma mais frequente, embora a maioria das espécies de *Brucella* spp seja encontrada no sêmen. Na monta natural, a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção, entretanto, cuidados especiais devem ser tomados com a inseminação artificial, visto que o sêmen é aplicado diretamente no útero, onde não existem barreiras inespecíficas, tornando-se um ambiente propício para multiplicação do agente (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

As bactérias do gênero *Brucella* também podem ser disseminadas entre os animais por fômites, destacando-se a água e alimentos contaminados (ACHA & SZYFRES, 2001). Este gênero sobrevive no ambiente, mas não se multiplicam nele. Possui ampla capacidade de sobrevivência, porém necessita de condições como presença de sombra, umidade, baixas temperaturas e pH neutro (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006; OIE, 2009).

A introdução dos animais infectados em rebanhos sadios constitui o principal risco nas propriedades rurais, por isso o comércio de animais só deve ocorrer quando a condição sanitária seja conhecida, sendo o ideal a procedência de rebanhos livres ou então que sejam submetidos a testes de diagnóstico que garantam a sanidade do rebanho (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Várias espécies domésticas ou silvestres são suscetíveis à infecção por *Brucella* spp, mas por não transmitirem o agente novamente aos bovinos, são consideradas apenas como hospedeiros finais da infecção. Os bovinos são os hospedeiros preferenciais da *B. abortus*, porém bubalinos, equinos, suínos, ovinos, caprinos e cães podem ser infectados (LAGE et al., 2008; MINHARRO, 2009).

Outras espécies de *Brucella* como *B. melitensis* e *B. suis* podem causar brucelose em bovinos devido ao convívio com cabras ou ovinos e suínos, que são respectivamente, os reservatórios naturais desses agentes (ACHA & SZYFRES, 2001; OIE, 2009).

Os cães de fazenda não são considerados como os principais reservatórios de *B. abortus*, porém podem ser responsáveis pela disseminação da doença por normalmente carregarem produtos de abortos. Além disso, o agente pode ser isolado

dos cães quando na presença de bovinos infectados, devendo ser incluídos nos programas de controle e erradicação da doença (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

Entre as espécies que apresentam importância na epidemiologia da brucelose bovina, podem ser citados além dos cães, os equídeos que, quando convivem com bovinos infectados, podem apresentar lesões articulares crônicas, porém, raramente abortam (RIBEIRO et al., 2003; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Na inspeção sanitária realizada em matadouros-frigoríficos, os inspetores veterinários realizam o julgamento de carcaças e vísceras de bovinos suspeitos de brucelose mediante a observação macroscópica de lesões sugestivas da enfermidade, não dispondo de meios de diagnóstico específicos que possam associar diretamente as alterações observadas nos exames sanitários com a infecção brucélica (FREITAS & OLIVEIRA, 2005).

As bursites de cernelha de bovinos são de difícil visualização à inspeção *ante-mortem*, sendo o diagnóstico macroscópico realizado durante a inspeção *post-mortem*, por inspetores veterinários (PARDI et al., 1956; LANGENEGGER et al., 1975; ALMEIDA et al., 2000).

Devido ao caráter zoonótico que o gênero *Brucella* apresenta, o artigo 163 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952) determina que carcaças que apresentarem lesões extensas de brucelose devem ser condenadas ou destinadas a esterilização pelo calor, após remoção das áreas atingidas a fim de eliminar qualquer fonte de contaminação aos consumidores destes alimentos.

Humanos normalmente se infectam pelo contato direto do agente com mucosas ou soluções de continuidade da pele, pela manipulação de tecidos, sangue, urina, secreções vaginais, fetos abortados e envoltórios fetais provenientes de animais infectados ou pela ingestão da bactéria em alimentos, geralmente de leite cru ou derivados lácteos não pasteurizados (queijos, manteigas, iogurtes, sorvetes) além de carnes cruas, mal assadas ou cozidas, obtidas de animais infectados (BRASIL, 2006; PAULIN & FERREIRA NETO, 2008).

Os sintomas mais frequentes de brucelose são febre intermitente, dores musculares, articulares, cefaléia e sudorese, sendo geralmente confundida com gripe recorrente. Outras complicações como endocardite e problemas articulares podem ocorrer, porém com menor frequência (SILVA et al., 2005; AL DAHOUK et al., 2007).

Esta zoonose pode ser considerada uma enfermidade de caráter ocupacional, pois afeta profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição ao agente (LAGE et al., 2008; MINHARRO, 2009; OIE, 2009). A capacidade de penetração pela pele íntegra ou lesada e pelas membranas mucosas, além da formação de aerossóis, predispõe os tratadores, veterinários, laboratoristas, trabalhadores de matadouros-frigoríficos e entrepostos de leite ao risco de infecção (LAGE et al., 2008).

LANGENEGGER et al. (1975) e PARDI et al. (2006), alertam sobre a possibilidade de contaminação em ambientes de abatedouros, visto ao risco de rompimento de bursites durante os procedimentos de manipulação, provocando extravasamento do conteúdo das bolsas mucosas e a conseqüente infecção dos operadores, contaminação de equipamentos e das instalações, além da formação de aerossóis. A carne não constitui importante fonte de veiculação de brucelose visto ao número reduzido do agente, porém traz riscos se estiver pouco cozida ou mal

assada. A medula óssea e vísceras mal cozidas também se constituem em importantes fontes de infecção humana.

A vacina B19 utilizada amplamente nos programas de controle e erradicação da brucelose é patogênica para o homem, havendo inúmeros relatos na literatura de infecções acidentais, especialmente entre veterinários e vacinadores, sendo necessária a utilização de equipamentos de proteção individual como máscara, óculos, luvas e avental de manga longa durante a vacinação (LAGE et al., 2008).

Nos laboratórios, a realização de diagnósticos diretos buscando o isolamento e identificação do agente a partir de amostras clínicas e a manipulação de massas bacterianas para a produção de vacinas e antígenos, constituem uma forma eficiente de infecção principalmente por formação de aerossóis, estando a bactéria incluída na lista de agentes biológicos com potencial bioterrorista (COSTA, 2001; MENSE et al., 2004; MINHARRO, 2009).

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

## Diagnóstico

### Métodos Indiretos

Os métodos indiretos ou sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose constituem-se em um importante recurso utilizado nas campanhas de controle e erradicação da doença em bovinos e bubalinos (OLIVEIRA, 2003).

Os testes sorológicos detectam os anticorpos contra *Brucella* spp presentes em diversos fluidos corporais como soro sanguíneo, muco vaginal, sêmen e leite. Para se escolher um método sorológico, deve-se levar em consideração o tamanho e as características da população a ser analisada, a situação epidemiológica da doença, a sensibilidade e a especificidade dos testes e principalmente se há utilização de vacinas (POESTER et al., 2005).

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da enfermidade, destacam-se o de Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAT), Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), 2- Mercaptoetanol (2-ME), Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Fixação de Complemento (FC), Rivanol e o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (OLIVEIRA, 2003; NIELSEN et al., 2004).

O PNCEBT definiu como oficiais os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o teste de Anel em Leite (TAL), como provas de triagem. Já como testes confirmatórios estabeleceu o teste do 2- Mercaptoetanol (2-ME) e a reação de Fixação do Complemento (FC) para detecção de antígenos pelo emprego de anticorpos específicos, com o objetivo de detectar uma exposição prévia do animal ao agente (BRASIL, 2006).

Os testes sorológicos empregados para o diagnóstico da brucelose identificam os anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo dos animais infectados, baseando-se em antígenos de superfície bacteriana, compostos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas de membrana externa (ALTON et al., 1988; RAJASHEKARA et al., 2005; MINHARRO, 2009).

De certa forma, testes sorológicos não apresentam sensibilidade absoluta, havendo a necessidade de associação entre várias técnicas em busca de melhores resultados na detecção de animais positivos, sobretudo na fase inicial da infecção e em infecções crônicas (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003).

Nestes testes podem ocorrer reações inespecíficas decorrentes do compartilhamento de epítomos com outros gêneros bacterianos ou até mesmo envolvendo imunoglobulinas da classe IgM, provenientes da vacinação contra brucelose, gerando resultados falso-positivos (ALTON et al., 1988; COSTA, 2001; MINHARRO, 2009).

Atualmente, acredita-se que os agentes como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:116 e O:157, *Bordetella bronchiseptica*, *Moraxela spp*, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana*, *Pseudomonas maltophilia*, *Staphylococcus spp*, *Campylobacter spp* e outros gêneros possam causar reações cruzadas em testes sorológicos, dificultando o diagnóstico por produzir resultados falso-positivos (COSTA, 2001; OLIVEIRA, 2003; MINHARRO, 2009).

#### Métodos Diretos

Os métodos diretos de diagnóstico para brucelose incluem o isolamento e a identificação do agente, a imunohistoquímica e os métodos de detecção de ácidos nucleicos, pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Geralmente, estes métodos são utilizados após a manifestação dos sinais clínicos, momento este em que a bactéria já se encontra disseminada no rebanho, sendo importante a confirmação de focos da doença e a caracterização do agente (VEJARANO RUIBAL, 2009; MATRONE, 2009).

A bacteriologia possui alta especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e biovariedades, sendo considerada *gold standard*. No entanto, o isolamento de *Brucella spp* é um processo trabalhoso, sendo necessários dias para a identificação do agente visto a sensibilidade e as exigências com relação aos meios de cultivo, além de se constituir um patógeno de alto risco biológico, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados, instalações e equipamentos de proteção de nível 3 (POESTER et al., 2005; LAGE et al., 2008).

Classicamente, o diagnóstico direto da brucelose é realizado a partir do cultivo, isolamento e a identificação do gênero *Brucella* oriundo de material de aborto ou de secreções como leite, sêmen e líquido sinovial de articulações comprometidas (CARTER & CHENGAPPA, 1991; NIELSEN, 2004; LAGE et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009). Em casos de aborto, o material de eleição são os anexos placentários e o conteúdo gástrico, além do baço, fígado, pulmão e rins dos fetos abortados.

Segundo PAULIN & FERREIRA NETO (2003), devem ser colhidos das carcaças de bovinos, no momento do abate, os linfonodos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos, mas principalmente os supramamários, onde o agente é isolado em quase 90% dos animais infectados. Entretanto, devido ao processo de replicação das brucelas e a posterior difusão através da corrente sanguínea e vasos linfáticos, há disseminação deste agente por todo o organismo, sendo possível sua identificação no fígado, baço, pulmões e rins, além dos linfonodos e trato genital (GORVEL & MORENO, 2002; CAMPAÑA et al., 2003; LIRA, 2008).

As brucelas podem ser isoladas e mantidas em meios de cultura como o ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5%, ágar Triptose e ágar *Brucella*. Durante o cultivo, a bactéria necessita de no mínimo três a cinco dias de incubação em um ambiente microaerófilo, com tensão de CO<sub>2</sub> em torno de 5 a 10%, além de temperatura média de 37°C e pH neutro 6.6 a 7.4 (MINHARRO, 2009; OIE, 2009).

Para inibir a multiplicação de contaminantes durante o isolamento,

recomenda-se a utilização do meio de Farrel por conter vários antimicrobianos (ácido nalidíxico, bacitracina, ciclohexamida, nistatina, polimixina B e vancomicina) que minimizam a contaminação bacteriana secundária (CARTER & CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO et al., 2008, MINHARRO, 2009).

No ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5%, as colônias apresentam-se pequenas, translúcidas, opacas, convexas e com bordos arredondados, após quatro a cinco dias de incubação (RIBEIRO et al., 2008).

As bactérias do gênero *Brucella* são Gram negativas, porém coram-se bem por outros métodos tintoriais como Ziehl-Neelsen e Koster modificados. À microscopia óptica, se apresentam como bastonetes curtos, isolados, aos pares ou em pequenos grupos (NIELSEN et al., 2004; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

As características bioquímicas deste gênero revelam, nos testes de classificação, a utilização de carboidratos, porém sem a produção de ácido ou gás em quantidades suficientes. Algumas cepas são catalase e oxidase positivas, não causam hemólise e muitas delas produzem urease, ácido sulfídrico e reduzem nitrato a nitritos (CARTER & CHENGAPPA, 1991, PAJUABA, 2006; RIBEIRO et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009).

A técnica de imunohistoquímica também constitui um método de diagnóstico direto, destacando pela alta praticidade e ausência da viabilidade do agente nos tecidos. Tem sido utilizada como técnica auxiliar nos estudos de patogenia e diagnósticos de enfermidades como a brucelose. Pode ser realizada a partir de materiais de aborto fixados com formol, permitindo além da identificação do agente com a especificidade das reações antígeno-anticorpo, a visualização das características das lesões examinadas (ANGREVES, 2008; MINHARRO, 2009; XAVIER et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase desenvolvida por MULLIS na década de 80 permite a detecção de um segmento específico de DNA por meio da amplificação enzimática *in vitro*, facilitando o diagnóstico direto de doenças infecciosas pela identificação do ácido nucléico do agente, além de superar as limitações relacionadas ao isolamento por métodos tradicionais de cultura de microrganismos (MULLIS & FALOONA, 1986; BAILY et al., 1992; NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

A detecção do DNA do agente bacteriano pela PCR apresenta enorme rapidez e sensibilidade, além da grande vantagem de detectar pequenas quantidades de microrganismos em diferentes substratos, sem a necessidade de estarem viáveis, como ocorre na cultura bacteriológica (FEKETE et al., 1992; CORTEZ et al., 2001; GLYNN et al., 2006; PERRY et al., 2007; ANGREVES, 2008; SILVA JÚNIOR, 2008).

Na reação de PCR convencional, o fragmento alvo é detectado após o término da reação (end-point) por eletroforese em gel, necessitando de um ligante de DNA para obter a coloração do produto de amplificação, acarretando assim um tempo maior para a visualização dos resultados, além da possibilidade de contaminação devido à manipulação dos amplicons (MACKAY, 2004).

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica criada por MULLIS (1986) e da descoberta de fluoróforos associada à utilização da tecnologia óptica e da informática, possibilitando o monitoramento da reação a cada momento, e principalmente, revolucionando os processos de quantificação de fragmentos de DNA e RNA (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004; DUARTE, 2006).

De acordo com RODRIGUEZ - LÁZARO et al. (2007), a técnica de PCR em Tempo Real permite o monitoramento da síntese dos fragmentos alvo no decorrer da própria reação e não apenas no final, como ocorre na técnica tradicional de PCR. Ela é capaz de monitorar a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção das amplificações em cada ciclo de PCR, gerando resultados com maior sensibilidade, precisão, velocidade nas análises, facilidade na quantificação, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação, já que a reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações.

Considerando a acurácia e a rapidez de execução que a PCR apresenta quando comparada ao cultivo bacteriológico, esta técnica tem se mostrado eficiente no diagnóstico direto de microrganismos, atuando como ferramenta epidemiológica na detecção de *Brucella* spp (BRICKER, 2002).

Diante da necessidade de acurácia e segurança nos diagnósticos das enfermidades, os protocolos para colheita de amostras vêm, a cada dia, proporcionando facilidades no transporte, armazenamento e manuseio de amostras biológicas.

Devido ao alto poder infectocontagioso das amostras clínicas, bem como os cuidados excessivos requeridos no transporte, armazenamento e manipulação das mesmas, o emprego de métodos alternativos como os cartões de celulose para o armazenamento de amostras - cartões FTA<sup>®</sup> - (WHATMAN, FTA<sup>®</sup> Technology, USA, 2007), vem ganhando destaque.

A tecnologia FTA<sup>®</sup> foi desenvolvida como método alternativo para colheita de DNA e estocagem de amostras de sangue em diagnóstico neonatal, sendo utilizado posteriormente em reações de PCR para análises médicas e forenses (CARDUCCI et al., 1992; VIDAL-TABOADA et al., 2006; FIGUEIRÓ, 2008).

Esta tecnologia vem proporcionando avanços nos processos de colheita, transporte, purificação e estocagem de amostras, reduzindo assim o custo e o tempo necessários para o processamento do DNA, além de facilitar a colheita de grandes quantidades de amostras (ORLANDI & LAMPEL, 2000; MAS et al., 2007; FIGUERÓ, 2008).

O cartão FTA<sup>®</sup> possui uma matriz fibrosa, onde se encontram agentes quelantes e desnaturantes adsorvidos, responsáveis por reter e lisar as membranas celulares e organelas, eliminando assim o poder infectocontagioso dos microrganismos, ao mesmo tempo em que libera o DNA e o imobiliza nas fibras da matriz do cartão. Aderidos a este material, estão presentes também, desnaturantes de proteínas e outros químicos responsáveis por proteger o DNA do ataque de nucleases, da oxidação e dos raios ultravioleta, permitindo a conservação do material genético por longos períodos, sob temperatura ambiente (ORLANDI & LAMPEL, 2000; GUTIÉRREZ-CORCHERO et al., 2002; NDUNGURU et al., 2005; RAJENDRAM et al., 2006; WHATMAN, 2007; OWOR et al., 2007).

Em decorrência da inativação dos microrganismos patogênicos, os cartões podem ser transportados sem qualquer risco biológico, podendo ser enviados aos laboratórios através do serviço postal regular, sem restrições quanto à manipulação, tornando-se uma ferramenta muito útil para a coleta de amostras biológicas de campo (PURVIS et al., 2006; GLASS et al., 2009; WOLFGRAMM et al., 2009).

Segundo BECKETT et al. (2008), as amostras armazenadas no cartão FTA<sup>®</sup> apresentam DNA de alta qualidade e cada amostra pode ser usada como molde para no mínimo 20 a 30 reações de PCR. Além do baixo custo dos cartões FTA<sup>®</sup>,

esta tecnologia permite a realização de diagnósticos rápidos, precisos e com aplicações em diferentes áreas da ciência como: na conservação do DNA humano (DOBBS et al., 2002), em amostras de DNA de animais selvagens (SMITH & BURGOYNE, 2004), para a caracterização molecular de vírus a partir de tecidos vegetais (NDUNGURU et al., 2005), caracterização molecular de patógenos que acometem aves (PURVIS et al., 2006), a caracterização molecular do vírus da raiva (PICARD-MEYER et al., 2007) e na colheita, armazenamento e transporte de amostras contendo o vírus da febre aftosa (MUTHUKRISHNAN et al., 2008).

Diante disso, GLASS et al. (2009) com a finalidade de avançar no diagnóstico molecular da tuberculose bovina, avaliaram a segurança biológica do material impregnado em cartão FTA<sup>®</sup>, pesquisando *Mycobacterium bovis* e outras micobactérias viáveis, por até cinco semanas de armazenamento. A eficiência do cartão na inativação do agente etiológico foi constatada nas concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Contudo, mediante dados parciais, contataram também que nos cartões impregnados com soluções mais concentradas (solução mãe) foram detectados bacilos viáveis. Entretanto, os resultados preliminares apresentaram-se promissores para armazenamento do DNA bacteriano nos cartões FTA<sup>®</sup> visto a eficiência na inativação do agente nas concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  do material inicial contendo células viáveis de *Mycobacterium bovis* e de outras micobactérias.

De acordo com SILVA JUNIOR (2008), a utilização de testes diagnósticos em rebanhos e, principalmente, em frigoríficos fornece dados sobre a situação epidemiológica, permitindo assim a detecção de focos de doenças e a adoção de medidas de controle. Conhecendo-se a procedência dos animais de abate, torna-se possível o acionamento e a integração dos órgãos responsáveis para que decisões sejam tomadas, por isso, a integração do serviço de fiscalização e monitoramento da Defesa Sanitária com o Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pode ser considerada ponto chave para o sucesso das atividades propostas pelo PNCEBT, visto a sua atuação tanto na proteção do consumidor quanto na vigilância epidemiológica.

A inspeção sanitária de carnes realizada em estabelecimentos de abate sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal realiza atividades preventivas importantes para a saúde pública, pois ao examinar carcaças e vísceras à busca de situações anormais que condicionam ou impedem o aproveitamento do produto ou matéria prima para o consumo, afasta assim do mercado consumidor carnes impróprias que podem ser prejudiciais a saúde humana (SILVA JÚNIOR, 2008; VIANA et al., 2010.).

### **Controle**

As estratégias de controle da brucelose têm como base a redução constante do número de focos da doença, além do controle do trânsito de animais de reprodução e a certificação de propriedades livres da enfermidade por meio do diagnóstico, sacrifício dos animais positivos e a adoção de medidas ambientais (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003).

A vacinação é empregada com o propósito de reduzir a prevalência da doença a baixos custos. Dentre as vacinas vivas mais utilizadas, a vacina B19 vem sendo amplamente empregada nos programas de controle da brucelose em diversos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

A vacina B19 é produzida com amostra viva atenuada da *B. abortus* bv. 1 estirpe B19. Apresenta características importantes tais como: permitir uma única

vacinação em fêmeas entre três e oito meses de idade conferindo imunidade prolongada; prevenir o aborto; ser estável e não se multiplicar na presença de eritritol; ser atenuada para bovinos, causando reações mínimas após a sua aplicação, além de conferir proteção em 70-80% dos animais vacinados (NICOLETTI, 1980; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

A idade de vacinação deve ser seguida rigorosamente, pois está relacionada com a persistência de anticorpos. A vacina B19 deve ser empregada somente em fêmeas jovens com até oito meses de idade, pois, após este período há probabilidade de uma grande produção de anticorpos que podem perdurar e interferir no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Não se recomenda a vacinação de machos ou fêmeas em gestação, devido à virulência residual que a cepa conserva, levando machos a permanecerem com títulos vacinais por longos períodos, além da possibilidade de desenvolvimento de orquite e artrites. Já em fêmeas prenhes, a vacina pode provocar o aborto, principalmente no terço final da gestação (BRASIL, 2006, LAGE et al., 2008).

Apesar dos inconvenientes que a vacina apresenta como não possuir efeito curativo e induzir a formação de anticorpos persistentes, o que reflete no diagnóstico em provas de rotina, gerando resultados falso-positivos, a resistência conferida ao rebanho pela vacina B19 reduz de forma significativa a severidade dos sinais clínicos, diminuindo a quantidade de agentes patogênicos eliminados no ambiente pelos animais infectados (NICOLETTI, 1980; PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

Diante da necessidade de obter uma amostra vacinal que não provocasse a indução de anticorpos vacinais, foi desenvolvida na década de 90, a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, a RB51. Esta amostra, praticamente isenta de cadeia O, foi obtida por passagens sucessivas da cepa 2308 de *B. abortus* em meios de cultura contendo rifampicina, originando uma mutante permanentemente rugosa, reduzindo assim, sua virulência (POESTER et al., 2005; GARCÍA-YOLDI et al., 2006; AMAKU et al., 2009).

A amostra RB51 possui características de proteção semelhantes à da B19, porém, por ser rugosa, previne a formação de anticorpos reagentes nos testes sorológicos de rotina, não interferindo no diagnóstico sorológico da enfermidade (POESTER, 2006; LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Em alguns países esta vacina é empregada oficialmente nos programas de controle de brucelose, porém no Brasil, a utilização da RB51 está restrita a vacinação estratégica de fêmeas adultas (BRASIL, 2006).

Os programas de controle e erradicação de uma enfermidade são estruturados principalmente na interrupção da cadeia de transmissão do agente através da eliminação de indivíduos infectados e no aumento do número de indivíduos resistentes na população. A vacinação constitui uma poderosa estratégia de controle, principalmente quando empregada de forma ampla com a utilização da vacina B19 em fêmeas jovens e a vacinação estratégica com RB51 em fêmeas com idade superior a oito meses. Desta forma, aumenta a cobertura vacinal e, conseqüentemente, diminui a porcentagem de indivíduos suscetíveis, a taxa de abortos e a taxa de infecção (LAGE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Com a redução da prevalência a níveis aceitáveis, a vacinação em massa se torna desnecessária e as estratégias de controle são alteradas para medidas de erradicação, cujo objetivo consiste na eliminação de todos os focos. A identificação destes focos tem como base a detecção de anticorpos no leite; a aplicação de testes



sorológicos em animais de reprodução sob trânsito e animais de reprodução descartados em abatedouros; a busca por produtores informais; a investigação de propriedades que apresentam relação epidemiológica com focos; a investigação de abortos bovinos e, principalmente, casos de brucelose humana (PAULIN & FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A brucelose é uma doença de caráter infeccioso causada por bactérias do gênero *Brucella* spp., sendo capaz de acometer várias espécies de animais domésticos e silvestres, além do homem. Apresenta-se como uma enfermidade de grande impacto na saúde pública e no setor econômico, capaz de gerar problemas significativos no comércio internacional de animais, abortos e baixa fertilidade nas propriedades rurais, altos custos com programas de controle e erradicação e principalmente por comprometer os produtos de origem animal tornando-os vulneráveis as barreiras sanitárias.

As consequências da brucelose nos animais são inúmeras e a maior preocupação é o efeito que ela causa no sistema reprodutivo. Os abortos podem ocorrer com frequência e na maioria das vezes, podem ser acompanhados de retenção de placenta, metrites, repetição deaios, diminuição do número de partos e um maior intervalo entre partos.

Nos seres humanos, a brucelose pode ser caracterizada como ocupacional, visto que os indivíduos mais expostos são os que trabalham diretamente com os animais infectados (tratadores, proprietários, veterinários) ou manipulam produtos de origem animal (magarefes, laboratoristas).

A brucelose encontra-se mundialmente distribuída, sendo considerada uma das principais zoonoses. Embora tenha sido erradicada em diversos países da região norte e central da Europa, Austrália, Japão e Nova Zelândia, continua re-emergente e se apresentando como um grave problema sanitário e econômico, principalmente em países da América do Sul, África, Oriente Médio e Ásia.

No Brasil, a brucelose é endêmica, porém apresenta dados bastante diferenciados face à dimensão territorial e às características próprias de cada região. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) busca uma redução na prevalência e na incidência da brucelose e tuberculose, através da vacinação obrigatória de fêmeas, com idade entre três a oito meses, contra a brucelose e a certificação de propriedades livres ou monitoradas para as doenças, trazendo assim, benefícios sanitários e econômicos, diminuindo o impacto negativo dessas zoonoses na saúde humana e animal, além de promover a competitividade da pecuária nacional.

### REFERÊNCIAS

ABIEC .Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - Exportações Brasileiras de Carne Bovina -Brazilian Beef Exports, 2014. Disponível em: [www.abiec.com.br](http://www.abiec.com.br)

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Volumem I: bacteriosis y micosis. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001, p. 28-56 (Publicación Científica,

580).

AL DAHOUK, S.; LE FLECHE, P.; NOCKLER, K.; JACQUES, I.; M. GRAYON, M.; SCHOLZ, H. C.; TOMASO, H.; VERGNAUD, G.; NEUBAUER, H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis, **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v. 69, p.137–145, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261338>.

ALMEIDA, L. P.; REIS, D. O.; GERMANO, P. M. L. Brucelose em bovinos com bursite cervical diagnosticada em abatedouro sob inspeção federal. **Ciência Rural**, Santa Maria, [online] v. 30, n. 2, abr. 2000. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782000000200015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782000000200015&lng=en&nrm=iso).

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. Paris, France, 190 p.

ANGREVES, G. M. **Avaliação etiológica de bursite cervical e correlação com a brucelose em bovinos abatidos no estado de Mato Grosso**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI, S. C.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, O. G. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Veterinaria México**, Mexico, [online], v. 32, n. 2, p. 131-139, abr-jun. 2001. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2001/vm012f.pdf>.

BAILY, G.G., KRAHN, J.B., DRASAR, B.S., STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, Oxford, [online], v. 95, n. 4, p. 271–275, ago. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1495123>.

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**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 367-382, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414157>.

BECKETT, S. M.; LAUGHTON, S. J.; POZZA, L. D.; MCCOWAGE, G. B.; MARSHALL, G.; COHN, R. J.; MILNES, E.; ASHTON, L. J. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiological studies examining pediatric populations. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, [online], v. 167, n. 10, p. 1260-1267. 2008. Disponível em: <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/reprint/167/10/1260>.

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. v. 2, p.1053-1066.

BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União, Brasília, seção I, p. 10785, 07 jul. 1952. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Boletim de defesa sanitária animal**, Brasília: MAPA, v. 30, n. 53-57, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD67FE040A8C07502246C>.

UFLA. Rastreabilidade e Segurança Alimentar. **Boletim Técnico**, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária. Lavras: UFLA, n. 91, 25p., 2012.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 435-446, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414163>.

BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 351-364, set. 1956. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2217862/>.

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

CAMPOS, D. I.; COELHO, H. E.; KAMIMURA, R.; ARANTES, V. M. A. Alterações microscópicas em linfonodos de bovinos sorologicamente positivos para brucelose. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, [online], v.12, n. 2, p. 123-127, jul./dez. 2009. Disponível em: <http://revistas.unipar.br/veterinaria/article/view/2965/2166>.

CARDOSO, P. G.; MACEDO, G. C.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S. C. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. **Microbial Cell Factories**, London, [online], v. 5, n. 13, mar. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435926/>.

CARDUCCI, C.; ELLUL, E.; ANTONOZZI, I.; PONTECORVI, A. DNA elution and amplification by polymerase chain reaction from dried blood spots. **Biotechniques**. London, v. 13, n. 5, p. 735-737, nov. 1992.

CARMICHAEL, L. E; BRUNER, D. W. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **The Cornell veterinarian**,

Ithaca, v. 48, n. 4, p. 579-592, out. 1968.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991. p. 196-201.

CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. Brucelose: Alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, Lisboa, [online], v. 2, n. 4, p. 259-261. 1995. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.; GRAYON, M.; PAQUET, J.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. **Microbes and Infection**, Paris, [online], v. 3, p. 729-738, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489421>.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an Overview. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, p. 213-221, 1997.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Madsj, 1992. p. 213-215.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; GENOVEZ, M.E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetus by polymerase chain reaction. **Australian veterinary journal**, Sydney, [online], v.79, n. 7, p. 500-501, jul. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549051>.

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

COSTA, I. C.; MESQUITA, A. J.; LINHARES, G. F. C.; FREITAS, M. R. Emprego da reação em cadeia da polimerase, ELISA, soroprecipitação rápida e cultivo microbiológico na elucidação da etiologia da bursite cervical. **Revista brasileira de ciência veterinária**, Niterói, v. 8, n. 3, p. 155-159, set./dez. 2001.

DOBBS, L. J.; MADIGAN, M. N.; CARTER, A. B.; EARLS, L. Use of FTA Gene Guard Filter Paper for the Storage and Transportation of Tumor Cells for Molecular Testing. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Chicago, [online], v. 126, n. 1, p 56-63, jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800648>.

DUARTE, C. A. B. **Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo real** [online]. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dSPACE.c3sl.ufpr.br/dSPACE/bitstream/1884/6246/1/56418CESAR%20AUGUSTO%20BARROS%20DUARTE%20TESE%20MESTRADO%20BIOLOGIA%20CELULAR.pdf>.

FEKETE, A.; BANTLE, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, Columbia, [online], v. 4, n. 1, p. 79-83, jan. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1554774>.

FIGUEIRÓ, A. A. **Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa e quantitativa** [online]. 2008. 83 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/25979>.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 57, p. 2688–2693, 2007. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/57/11/2688>.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. Pesquisa de infecção brucélica em bovídeos abatidos portadores de bursite. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v. 72, n. 4, p.427-433, out./dez., 2005. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72\\_4/freitas.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72_4/freitas.PDF).

GARCÍA-YOLDI, D.; MARÍN, C. M.; DE MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; VIZMANOS, J. L.; LÓPEZ-GOÑI, I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis*. **Clinical chemistry**, Washington, [online], v. 52, n. 4, p. 779–781, abr. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595839>.

GLASS, F.; COSTA, E. A.; PINHEIRO, S. R.; ROXO, E. Cartão de FTA para extração de DNA: viabilidade de utilização em micobactérias. In: Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais [online], 2009, São Paulo. **Resumos... O Biológico: São Paulo: Instituto Biológico**, 2009. v. 71. p. 19. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v71\\_2/p19.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v71_2/p19.pdf).

GLYNN, B.; LAHIFF, S.; WERNECKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T. J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, [online], v. 59, n. 2, p. 126- 139, 2006. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118633814/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.

GUTIÉRREZ-CORCHERO F., ARRUGA M. V., SANZ L., GARCÍA C., HERNÁNDEZ M. A., CAMPOS F. Using FTA<sup>®</sup> cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 75–77, mar. 2002.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J. J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, Les Ulis, [online],

v. 36, n. 3, p. 313-326, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845228>.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 281-297, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414149>.

HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **American journal of veterinary research**, Chicago, [online], v. 49, n. 7, p.1092– 1097, jul.1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3138931>.

HUDDLESON, I. F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. **American Journal of Public Health**, Boston, [online], v. 100, n. 5, p. 491–498, 1931. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1556486/>.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária – Março de 2014 2014. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201304\\_publica\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publica_completa.pdf).

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4. ed. v. 1. Academic Press: San Diego, 1993. p.183-439.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, [online], v. 32, p. 202-212, 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB206%20Lage%20vr2%20pag202-212.pdf>.

LANGENEGGER, J.; SECCHIN, H.; BAPTISTA, A. M. Bursites brucélicas na cernelha de bovinos de abate e cuidados sanitários no matadouro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio De Janeiro, v.10, p.45-49, 1975.

LIRA, N. S. C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepuccial e conjuntival simultaneamente** [online], 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=113320](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=113320).

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infectious**, Oxford, [online], v.10, n.3, p.190-212, mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>.

MAS, S.; CRESCENTI, A.; GASSÓ, P.; VIDAL-TABOADA, J. M.; LAFUENTE, A. DNA cards: determinants of DNA yield and quality in collecting genetic samples for

pharmacogenetic studies. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Copenhagen, [online], v. 101, n. 2, p. 132-137, aug. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651316>.

MATRONE, M.; KEID, L. B.; ROCHA, V. C. M.; VEJARANO, M. P.; IKUTA, C. Y.; RODRIGUEZ, C. A. R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, [online], v. 40, p. 480-489, 2009. Disponível em: [http://200.144.190.38:8180/xmlui/bitstream/handle/1/341/FMVZ\\_VPS\\_ART\\_FERREIRA\\_Evaluation%20of%20DNA\\_2009.pdf?sequence=1](http://200.144.190.38:8180/xmlui/bitstream/handle/1/341/FMVZ_VPS_ART_FERREIRA_Evaluation%20of%20DNA_2009.pdf?sequence=1).

MENSE, M.G.; BORSCHER, R.H.; WILHELMSSEN, C.L.; PITT, M.L.; HOOVER, D.L. Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, [online], v. 65, n. 5, 2004. Disponível em: [http://www.avma.org/avmacollections/zu/ajvr\\_65\\_5\\_644.pdf](http://www.avma.org/avmacollections/zu/ajvr_65_5_644.pdf).

MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, [online], v. 38, p. 17-22, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v38n1/arq05.pdf>.

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

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, n. 1-4, p. 209–227, dez. 2002. Disponível em; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414145>.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1986.

MUTHUKRISHNAN, M.; SINGANALLUR, N. B.; RALLA, K.; VILLUPPANOOR, S. A. Evaluation of FTA<sup>®</sup> cards as a laboratory and field sampling device for the detection of foot-and-mouth disease virus and serotyping by RT-PCR and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, [online], v. 151, n. 2, p. 311-316, ago. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584888>.

NDUNGURU, J.; TAYLOR, N.J.; YADAV, J.; ALY, H.; LEGG, J.P.; AVELING, T.; THOMPSON, G. e FAUQUET, C.M. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived

transgenes from plant tissues. **Virology Journal**, London, [online], v. 2, n. 45, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904535>.

NETA, A. V. C.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXAO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, London, [online], v. 184, n. 2; p. 146-155, sep. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733101>.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in veterinary science comparative medicine**, New York, v. 24, p.69-98, 1980.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v.90, n.1-4, p.5-9, dez. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414128>.

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

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>.

NOZAKI, C.N. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação de métodos diagnósticos nas fases da evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*** [online]. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Botucatu. Disponível em: [http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064022P3/2008/nozaki\\_cn\\_dr\\_botfmvz.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064022P3/2008/nozaki_cn_dr_botfmvz.pdf).

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code**. 2013. Chapter 11.3. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2009/en\\_chapitre\\_1.11\\_3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2009/en_chapitre_1.11_3.htm).

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

ORLANDI, P. A.; LAMPEL, K. A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, [online], v. 38, n. 6, p. 2271-2277, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834988>.

OWOR, B. E.; SHEPHERD, D. N.; TAYLOR, N. J.; EDEMA, R.; MONJANE, A. L.; THOMSON, J. A.; MARTIN, D. P.; VARSANI, A. Successful application of FTA<sup>®</sup>



Classic Card technology and use of bacteriophage phi29 DNA polymerase for large-scale field sampling and cloning of complete maize streak virus genomes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.140, p.100–105, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174409>.

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** [online]. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14092007-144915/pt-br.php>.

PAJUABA, A. C. A. M. **Avaliação de frações hidrofóbicas e hidrofílicas de *Brucella abortus* em ensaios imunoenzimáticos para caracterizar o perfil de anticorpos produzidos por bovinos vacinados e não-vacinados** [online]. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. Disponível em: [http://www.bdtu.ufu.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=502](http://www.bdtu.ufu.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=502).

PARDI, M.C.; ROCHA, U.F.; SALIBRA, A. *Brucella abortus* (Bang) como causa de bursite cervical em bovinos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio De Janeiro, v. 24, p. 25- 34,1956.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. Aspectos higiênico-sanitários da carne. Zoonoses mais comuns adquiridas profissionalmente por manipuladores de carne. In: **Ciência, higiene e tecnologia da carne**, 2 ed.,Goiânia: CEGRAF-UFG/ Niterói: EDUFF, 2006. p. 358-359.

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

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

PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN S.; DOMÍNGUEZ, W.; APPLGATE B. Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of applied Methods & Automation in Microbiology**, Washington, [on line], v. 15, n. 2, p. 176-198, 2007. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4581.2007.00083.x/pdf>.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. **Medicina Interna**, Lisboa, [online], v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol10/vol10-n2-brucelose.pdf>.

PICARD-MEYER, E.; BARRAT, J.; CLIQUET, F. Use of filter paper (FTA<sup>®</sup>) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. **Journal of virological methods**, Amsterdam, [online], v. 140, n. 1-2, p. 174–182, mar. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157394>.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, [online], v. 90, p.55-62, 2002. Disponível em: <http://cniia.inta.gov.ar/zoonosis/pdf%20Publ.y%20otr/Brucellosis%20in%20Brazil.pdf>.

POESTER, F. P., SAMARTINO, L. E. LAGE, A. P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n. 47, p.13-29, 2005.

POESTER, F. P. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas** [online]. 2006. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/Eventos/Especializacao/disciplinas/ModuloIII/EFICACIA%20DA%20VACINA%20RB51%20EM%20NOVILHAS.pdf>.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, 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 e Zootecnia, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, supl. 1, p.1-5, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61s1/a01v61s1.pdf>.

PROBERT, W.S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L.; GRAVES, M. H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, [online], v. 42, n. 3, p. 1290-1293, mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004098>.

PURVIS, L. B.; VILLEGAS, P.; PEROZO, F. Evaluation of FTA<sup>®</sup> paper and phenol for storage, extraction and molecular characterization of infectious bursal disease virus. **Journal of virological methods**, Amsterdam, [online], v. 138, n.1-2, p. 66–69, dez. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978712>.

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

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

RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F. M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H. N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA<sup>®</sup> matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, [online], v. 67, n. 3 p. 582–592, 2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859786>.

REDKAR, R., ROSE, S., BRICKER, B., DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and cellular probes**, London, [online], v. 15, n. 1, p. 43-52, fev. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162079>.

RIBEIRO, M.G.; NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P. Aglutininas anti-*Brucella abortus* no soro e em secreção de bursite cervical em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, fev. 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352003000100015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352003000100015&script=sci_arttext).

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; ALMEIDA, C. A. S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, [online], v.32, n. 2, p.83-92, abr./jun. 2008. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZKA, A.; D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNANDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, [online], v. 18, p. 306-319, 2007. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6VHY4N1466T2&\\_user=10&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=5ba1113d42971418aa24a3c2132af46a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VHY4N1466T2&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=5ba1113d42971418aa24a3c2132af46a)

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

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, [online], v. 60, n. 4, p. 801-808, abri. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661515>.

SILVA, F. L.; PAIXÃO, T. A.; BORGES, A. M.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG: FEP/MVZ, n.47, p.1-12, 2005

SILVA JUNIOR, F. F. **Diagnóstico da brucelose bovina em animais de frigoríficos pela sorologia, bacteriologia e PCR**. 2008. 64f. Tese. (Doutorado em Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA<sup>®</sup> databasing paper. **BioMed Central Ecology**, Londres, [online], v. 4, n. 4, p. 1472-6785, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC406513/>.

STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat *Neotoma lepida* Thomas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, out. 1957.

VELASCO, J.; BENGOCHEA, J. A.; BRANDENBURG, K.; LINDNER, B.; SEYDEL, U.; GONZALEZ, D.; ZÄHRINGER, U.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative *Ochrobactrum* spp, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. **Infection and Immunity**, Washington, [online], v. 68, n. 6, p. 3210–3218, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816465>.

VEJARANO RUIBAL, M. D. P. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308** [online]. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-13072009-111831/pt-br.php>.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082 p.

VIANA, L.; BAPTISTA, F.; TELES, J. RIBEIRO, A. P. C.; PIGATTO, C. P. Soropositividade e lesões sugestivas de brucelose em bovinos abatidos no estado de Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, [online], v.77, n.3, p.517-520, jul./set., 2010. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v77\\_3/viana.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v77_3/viana.pdf).

VIDAL-TABOADA, J. M.; CUCALA, M.; HERRERO, S. M.; LAFUENTE, A.; COBOS, A. Satisfaction survey with DNA cards method to collect genetic samples for pharmacogenetics studies. **BMC Medical Genetics**, London, [online], v. 7, n. 45, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479321/>.

VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados** [online]. 2004. 92f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-16062005-103008/pt-br.php>.

XAVIER, M. N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos** [online]. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta\\_\\_o\\_mnx\\_final.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA7YSH6J/1/disserta__o_mnx_final.pdf).

WHATMAN. **FTA<sup>®</sup> nucleic acid collection, storage and purification**, USA, 2007. Disponível em: <http://www.whatman.com/FTANucleicAcidollectionStorageandPurification.aspx>.

WHATMAN. **FTA<sup>®</sup> Elute Technology**, USA, 2009. Disponível em: <http://www.whatman.com/FTAElute.aspx>.

WOLFGRAMM, E. V.; CARVALHO, F. M.; AGUIAR, V. R.; SARTORI, M. P.; HIRSCHFELD-CAMPOLONGO, G. C.; TSUSUMIDA, W. M.; LOURO, I. D. Simplified Buccal DNA Extraction with FTA<sup>®</sup> Elute Cards. **Forensic science international: Genetics**, Amsterdam, [online], v. 3, n. 2, p. 125–127, mar. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19215882>.