

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
MARCUS VINÍCIUS DIAS FALCÃO

Desenvolvimento e padronização da técnica de *Western Blotting*
para o diagnóstico da brucelose bovina

RECIFE-PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
MARCUS VINÍCIUS DIAS FALCÃO

**Desenvolvimento e Padronização da Técnica de *Western Blotting*
para o Diagnóstico da Brucelose Bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia Animal, área de concentração de
Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr.
Rinaldo Aparecido Mota.

RECIFE-PE

2017

MARCUS VINÍCIUS DIAS FALCÃO

**Desenvolvimento e Padronização da Técnica de *Western Blotting*
para o Diagnóstico da Brucelose Bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal, área de concentração de Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.

Aprovado em: 23/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Professor Titular de Doenças Infecciosas – UFRPE
Orientador

Dra. Vania Lucia de Assis Santana
Fiscal Federal Agropecuário – MAPA

Profa. Dra. Rita de Cassia Carvalho Maia
Professora Associada I – Viroses dos Animais Domésticos – UFRPE

Resumo: A brucelose é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico causada por bactérias do gênero *Brucella spp.* Objetivou-se desenvolver e padronizar uma técnica de *Western Blotting* para uso no sorodiagnóstico da brucelose bovina. Dois grupos foram utilizados: o grupo I com 60 amostras de animais verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, sendo 30 positivas e 30 negativas no TFC e o grupo II com 383 amostras de amostras de campo, sendo 90 positivas e 293 negativas na TFC. O resultado da análise das amostras no *Western Blotting* revelou banda com peso molecular ≤ 20 kDa como sendo a banda mais reativo e propriedade para identificação e separação de animais com infecção natural dos animais vacinados. A sensibilidade e especificidade do WB quando comparadas com o AAT foi, respectivamente, 93% e 99%, e quando comparadas com a TFC foi respectivamente, 97% e 98%. O WB padronizado neste estudo poderá ser empregado teste confirmatório, pois se trata de um teste mais sensível e específico e com capacidade de diferenciação entre animais naturalmente infectados e vacinados.

Palavras chaves: *Brucella abortus*, Imunodiagnóstico, Proteômica.

Abstract: Brucellosis is an infectious disease with a chronic characteristic caused by the bacteria *Brucella* spp. The aim of this study was to develop and standardize a Western Blotting technique for use in bovine brucellosis serodiagnosis. Two groups were used: group I with 60 samples of true positive and true negative animals being 30 positive and 30 negative in CFT and group II with 383 field samples being 90 positive and 293 negative in CFT. The analysis using WB technique revealed the molecular weight ≤ 20 kDa as the most characteristic and reactive area for identification and separation of animals with natural infection from vaccinated. The sensitivity and specificity of WB as compared to AAT were 93% and 99% respectively, and when compared to TFC respectively were 97% and 98%. The WB standardized in this study may be used as confirmatory test, because it is more sensitive and specific with capacity for differentiation between naturally infected and vaccinated animals.

Keywords: *Brucella abortus*, Immunodiagnosis, Proteomics.

Sumário

1 – Introdução	10
2 – Revisão Bibliográfica	11
2.1 – Etiologia	11
2.2 – Epidemiologia.....	12
2.3 – Patogenia e Sinais Clínicos	17
2.4 – Diagnóstico	19
2.4.1 – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou Teste de Rosa Bengala (RBT)	20
2.4.2 – Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT) e Teste de 2-Mercaptoetanol (2-ME)	21
2.4.3 – Teste de Polarização Fluorescente (FPA)	21
2.4.4 – Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	22
2.4.5 – Teste de Fixação do Complemento (TFC).....	23
2.4.6 - <i>Western Blotting</i> (WB)	24
2.5 – Controle e Profilaxia	25
3 – Objetivos	26
3.1 – Geral	26
3.2 – Específicos.....	26
4 – Referências	27
5 – Artigo Científico	44

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 Gel bis - tris 3% a 15% corado por prata para visualização do antígeno impregnado e identificação do peso molecular.	43
Figura 2 Tiras de membranas impregnadas pelo NBT – BCIP. A e B, soropositivos; C e D, soronegativos.	49

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1	Artigos publicados sobre a brucelose bovina no Brasil entre os anos de 2006 a 2016.	14
-----------------	---	-----------

Lista de Gráficos

	Página
Gráfico 1 Número de casos notificados de brucelose por estado brasileiro no ano de 2015 (OIE, 2012).	13

Lista de Abreviaturas

2 – ME	Teste de 2 – Mercaptoetanol
2D – DIGE	2-D Fluorescência Diferença Gel Eletroforese
AAT	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BPAT	Teste do Antígeno Brucélico Ácido Tamponado em Placa
ELISA	Enzyme – Linked Immunosorbent Assay
ELISAc	Enzyme – Linked Immunosorbent Assay Competitivo
ELISAi	Enzyme – Linked Immunosorbent Assay Indireto
FC	Fixação do Complemento
FPA	Teste de Polarização Fluorescente
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G classe 1
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Quilodaltons
LANAGRO – PE	Laboratório Nacional Agropecuário do estado de Pernambuco
LPS	Lipopolissacarídeo
LPS – O	Lipopolissacarídeo com antígeno "O"
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMP28	Proteína Externa de Membrana 28
P.A.	Pureza Analítica
PBS	Solução de Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RBT	Teste de Rosa Bengala
SAT	Soroaglutinação Lenta em Tubos
TAL	Teste do Anel do Leite
TFC	Teste de Fixação do Complemento
WB	<i>Western Blotting</i>

1 – Introdução

O rebanho bovino brasileiro é estimado em mais de 200 milhões de cabeças e a região Nordeste possui mais de 28 milhões de animais. Como grande produtor de carne bovina, o Brasil fica em segundo lugar no *ranking* mundial, atrás apenas dos Estados Unidos. No segundo trimestre de 2013 atingiu um novo recorde comparado ao primeiro trimestre de 2013, com a marca de mais de 8 milhões de cabeças abatidas (IBGE, 2009; FAO, 2012). Com todo esse potencial produtivo, as afecções infecciosas são causas de grandes perdas e dentre estas a brucelose tem grande importância.

A brucelose é uma doença infectocontagiosa que acomete os bovinos e bubalinos, dentre outros animais, e causa graves perdas econômicas. Sua presença em uma região ou país resulta em custos diretos e/ou indiretos para as propriedades rurais e para indústria animal, tais como redução no preço da carne, do leite e derivados, desvalorização dos produtos para mercado externo e alto custo com pesquisas, programas de controle e erradicação (TEIXEIRA et al., 1998). Com rápida disseminação, a brucelose leva ao comprometimento na produção animal, principalmente na produção de leite e de carne (BATHKE, 1999).

O isolamento de *Brucella abortus* é considerado o método de diagnóstico mais confiável; entretanto, a complexidade de execução e elevado custo dificultam o seu emprego como método de controle da doença (VASCONCELLOS et al., 1987). Neste caso, o uso de técnicas sorológicas apresenta maior importância na rotina laboratorial (ALTON et al., 1988). Existem diversas provas sorológicas para o diagnóstico da brucelose bovina, porém o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) considera oficiais para o diagnóstico sorológico da doença apenas as provas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), teste de Polarização Fluorescente (FPA), Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação do Complemento (FC) (NIELSEN, 2000; BRASIL, 2006, BRASIL, 2016).

O *Western Blotting* (WB) foi primeiramente descrito em 1979 por Towbin e colaboradores e até hoje é um método amplamente utilizado como ferramenta laboratorial. Elschner et al. (2011) utilizaram esta técnica para o diagnóstico sorológico do mormo e comprovaram que é uma ferramenta bastante sensível e específica, além de possuir baixo custo para a produção do antígeno. Há uma necessidade de uso de

proteínas imunogênicas para obter testes sorológicos mais específicos para tornar o WB uma técnica útil para países que possuem doença ocorrendo de forma endêmica (ELSCHNER et al., 2011; WARETH et al., 2014).

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Etiologia

As bactérias do gênero *Brucella* spp. são cocobacilos Gram negativos com diâmetro variando entre 0,5 a 0,7 µm e largura de 0,6 a 1,5 µm. Em cultura, geralmente são encontradas isoladas, mas podem ser vistas aos pares ou em pequenos grupos. Não possui flagelo, portanto não apresentam motilidade, além de não apresentarem *pili* e cápsula verdadeira (MEGID & MATHIAS, 2016). Contudo, Megid & Mathias (2016) também descreveram a presença de flagelo em *B. melitensis* e o gene codificador nas espécies *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. microti*. São bactérias aeróbicas e algumas cepas necessitam de CO₂ suplementar para o isolamento, temperatura de 37°C e pH entre 6,6 a 7,4 (OIE, 2012).

Esta bactéria causa a brucelose, uma antropozoonose de caráter crônico (METCALF et al., 1994; BATHKE, 1999) também conhecida como aborto de Bang ou febre ondulante. É dividida em 12 espécies, de acordo com seus antígenos e características bioquímicas e seus principais hospedeiros (GODFROID et al., 2011; WHATMORE et al., 2014; SCHOLZ et al., 2016).

O gênero é classificado por sua conformação de colônia: *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* que formam colônias lisas, enquanto *B. canis* e *B. ovis* produzem colônias rugosas. As espécies não possuem especificidade quanto ao hospedeiro, entretanto possuem preferência, como *B. abortus* que acomete preferencialmente os bovinos e bubalinos, *B. suis* que acomete os suínos, *B. melitensis*, os caprinos, *B. ovis*, os ovinos e *B. canis*, os canídeos (BANG, 1897; CARTER, 1991; CULTUER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008). Recentemente foi descrita *B. vulpis* sp. nov. isolada de raposas vermelhas na Áustria (SCHOLZ et al., 2016).

Culturas de brucelas lisas possuem margem lisa, aspecto translúcido e coloração amarelo-pálida quando vistas à luz; quando visualizadas de cima apresentam coloração branco-perolada de aparência convexa e com o tempo a coloração torna-se enegrecida. Diferentemente, as espécies rugosas possuem colônias muito menos transparentes com superfície granular/amorfa e coloração branco-fosco a amarronzada. Com a realização do teste de impregnação por cristal violeta, as colônias lisas não captam o corante ou adquirem uma coloração amarelo-pálida, enquanto que as colônias rugosas se coram em vermelho/violeta (OIE, 2012).

O lipopolissacarídeo (LPS) de membrana é o principal fator responsável pela virulência, ou seja, a capacidade de estimular o sistema imunológico do hospedeiro para a produção de anticorpos e sensibilidade à fagocitose; também é o responsável pela especificidade do gênero (LAPAQUE et al., 2006; OIE, 2012). Em colônias lisas e rugosas, o LPS é composto pelo lipídeo “A”, entretanto, as brucelas de colônia lisa também há na constituição do LPS a cadeia “O”. O lipídeo “A” é formado por uma cadeia longa de ácidos graxos e o centro composto por manose, glicose, quinovosamina, glucosamina e alguns açúcares ainda não definidos. A cadeia “O” é a parte hidrofílica formada por homopolímeros de N-formil-perosamina (4 - amino, 4, 6 - dideoximanose) (MEGID & MATHIAS, 2016).

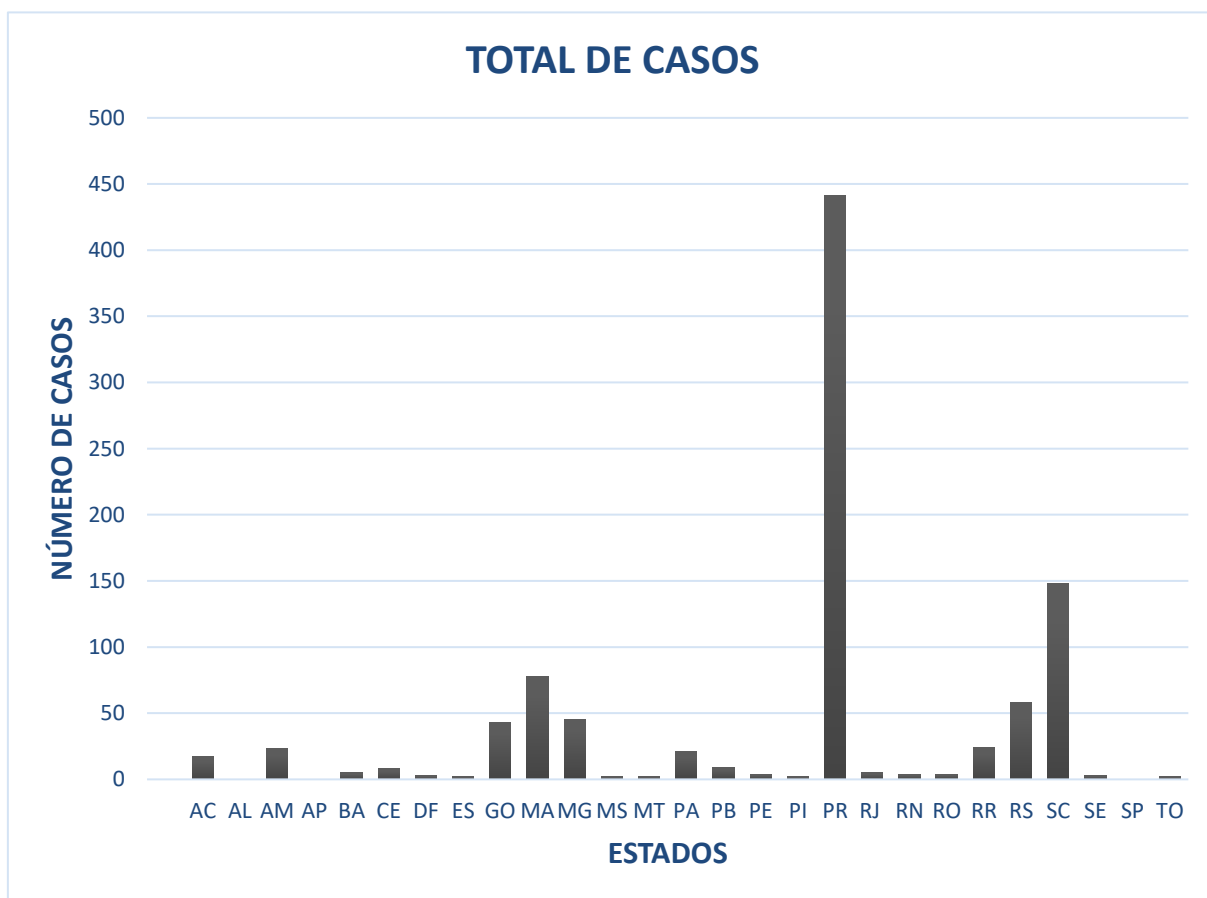
A resistência da bactéria pode variar de acordo com o material em que a bactéria se encontra no ambiente, observando-se uma resistência de 4 a 5 horas na luz solar até 200 dias em exsudato uterino (BRASIL, 2006). Agentes como o álcool etílico a 70%, produtos clorados com 2,5% de cloro ativo, solução com formaldeídos a 2% em temperatura ambiente de 15°C, compostos fenólicos a 2,5% e ação do carbonato de cálcio a 1:10 destroem a bactéria (OMS, 1986).

2.2 – Epidemiologia

A brucelose acomete todos os animais domésticos, vários animais silvestres e o homem. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), esta doença é endêmica no Brasil entre os animais domésticos e apenas os estados de São Paulo (SP), Amapá (AP) e Alagoas (AL) não registraram casos da doença no

ano de 2015 (Gráfico 1), destacando a disseminação da doença no país (OIE, 2012). Esta é uma enfermidade amplamente estudada no Brasil com diversos artigos publicados (Tabela 1).

Gráfico 1: Número de casos suspeitos notificados de brucelose por estado brasileiro no ano de 2015 (OIE, 2012).



O gráfico mostra o total de casos suspeitos notificados no ano de 2015 no Brasil, casos estes que geraram medidas de controle dos órgãos fiscalizadores competentes, posterior a notificação, devem ser realizados os testes sorológicos adequados para confirmação dos casos.

Tabela 1: Artigos publicados sobre a brucelose bovina no Brasil entre os anos de 2006 a 2016.

Autor	Técnica	Prevalência	Ano	Estado
GONÇALVES et al.	AAT/ 2 – ME	0,66%	2006	PR
POESTER et al.	AAT/SAT/2 – ME	100%	2006	MG
PAIXÃO et al.	PCR Convencional	42 – 43%	2007	MG
LILENBAU et al.	2 – ME	0,5%	2007	RJ
RAMOS et al.	TFC	4%	2008	TO
CARVALHO NETA et al.	PCR – <i>real time</i>	100%	2008	MG
XAVIER et al.	Isolamento / Histopatológico/ Imunohistoquímica	100%	2009	MG
TRANT et al.	PCR/Isolamento/ <i>Western blotting</i>	60%	2010	MG
PAJUABA et al.	ELISA indireto	<50%	2010	MG
CARVALHO NETA et al.	Histopatológico	100%	2010	MG
OLIVEIRA et al.	<i>Western blotting</i>	100%	2011	SP
DE ALMEIDA et al.	PCR real time/ELISA	100%	2011	MG
SILVA et al.	Histopatológico	100%	2011	MG

SALES IDOS et al.	2 – ME/SAT/BPAT	92,86%	2012	RJ
OLIVEIRA-FILHO et al.	AAT/TFC/IDGA	19%	2012	PE
PAJUABA et al.	TFC/SAT/ Imunobloting	50%	2012	MG
NAVES et al.	2 – ME/TFC/FPA/ ELISA indireto	11,7%	2012	MG
NARDI et al.	AAT/2 – ME/TFC	95%	2012	SP
RODRIGUES et al.	ELISA/PCR	2,72%	2013	MG
MINHARRO et al.	PCR	67,1%	2013	MG
CORSETTI et al.	PCR	100%	2013	MG
DORNELES et al.	PCR	100%	2013	MG
MIRANDA et al.	PCR	100%	2013	MG
GOMES et al.	Histopatológico/ <i>Western blotting</i>	100%	2013	MG
DE ALMEIDA et al.	PCR tempo real/ <i>Western blotting</i> /ensaio de luciferase	100%	2013	MG
MACEDO et al.	Isolamento/PCR	100%	2013	MG
BORBA et al.	AAT/2 – ME	11,4%	2013	SP

JUNQUEIRA JUNIOR et al.	PCR	30,68%	2013	MG
MOL et al.	Isolamento/PCR tempo real	100%	2014	MG
DORNELES et al.	Isolamento	8 – 10,5%	2014	MG
VICENTE et al.	Isolamento	0%	2014	SP
MOLINA et al.	AAT	0%	2014	SP
DA SILVA et al.	BPAT/2 - ME	10,11%	2014	SP
FURTADO et al.	AAT	66,7 – 100%	2015	GO
DORNELES et al.	AAT/SAT/2 - ME/ELISA indireto	100%	2015	MG
JUNQUEIRA et al.	AAT/SAT	4,28%	2015	MG
DOS SANTOS et al.	Isolamento/PCR tempo real	100%	2015	MA
ONUMA et al.	AAT	0%	2015	MT
CHIEBAO et al.	AAT/SAT/2 - ME	41,3%	2015	SP
MIRANDA et al.	Isolamento/PCR	0,4%	2016	MG
MOL et al.	Isolamento/ 2DE - DIGE	72%	2016	MG
COSTA et al.	IDGA/ELISA/ AAT/PCR	61,1%	2016	MG

A transmissão de *Brucella abortus* pode ocorrer por meio da utilização de sêmen contaminado na inseminação artificial, pastagem, água, alimentos, fômites e monta natural. Esta última forma de transmissão é considerada de baixo risco devido às barreiras naturais da vagina da vaca, sendo a época de abortos e o puerpério os períodos onde há maior disseminação bacteriana (GDIS/OIE, 2016).

O agente se dissemina no rebanho de diversas formas, e os principais fatores de risco relatados são: introduções de fêmeas prenhas ou vazias infectadas, touros infectados e recém-nascidos que eliminam a bactéria nas fezes, contaminam o ambiente e disseminam a bactéria (OMS, 1986; ACHA & SZYFRES, 1986; GDIS/OIE, 2016). Outros fatores de risco associados à brucelose são: sexo, raça, idade (KABI et al., 2015; MUGIZI et al., 2015; ASGEDOM et al., 2016), sistema de produção, presença de animais selvagens, presença de outros animais domésticos na propriedade (ANKA et al., 2014), confinamento dos animais, introdução de animais novos sem garantia da origem e sem realização de teste comprovando a ausência de infecção (MUSALLAM et al., 2015), histórico de aborto na propriedade (ASGEDOM et al., 2016), mistura de rebanhos bovinos com pequenos ruminantes (AZNAR et al., 2015), troca de touros utilizados na reprodução e influência sociocultural (ALHAJI et al., 2016).

2.3 – Patogenia e Sinais Clínicos

Há vários fatores que influenciam no desenvolvimento da brucelose, tais como a virulência da cepa bacteriana e a imunidade do hospedeiro, podendo a doença variar da forma clínica conhecida até casos de infecção subclínica (BISHOP et al., 1994).

A infecção se inicia com a penetração das brucelas nas mucosas ou soluções de continuidade posterior fagocitose por macrófagos e, resistindo a fagocitose, são então carregadas até o centro linfático mais próximo, onde ocorre a multiplicação e permanecem incubadas por semanas a meses (14 a 180 dias). Após a incubação, a bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, via linfa ou ainda no interior de macrófagos, ocasionando bacteremia. Neste momento ocorre a disseminação da bactéria para os tecidos com tropismo do sistema mononuclear fagocitário, causando

alterações inflamatórias caracterizadas por granulomas difusos, hepatoesplenomegalia e hiperplasia linfóide (BATHKE, 1999; CHAND et al., 2002; KO & SPLITTER, 2003; LAPAQUE et al., 2005; MUÑOZ et al., 2008; CAPPARELLI et al., 2009).

Órgãos que contêm o eritritol são considerados de predileção, pois este é um composto necessário para o metabolismo bacteriano. Essa substância é encontrada no útero gravídico, placenta, órgãos do sistema reprodutor masculino e tecidos osteoarticulares (CARTER, 1991).

No quinto mês de gestação, a concentração de eritritol aumenta, atingindo níveis máximos próximo ao parto; neste momento a infecção deixa de ser latente e ocorre intensa multiplicação bacteriana (BISHOP et al., 1994), gerando lesões no tecido cório-alantóideo, placentite necrótica, descolamento das vilosidades e morte fetal pelo baixo suprimento sanguíneo (BATHKE, 1999; GRASSO-PAULIN, 2000; SCHOLZ & VERGNAUD, 2013). Há casos de ocorrência de uma área necrótica menor, com maior depósito de fibrina, e conseqüentemente aborto tardio com retenção de placenta; a gestação também pode ocorrer, porém resulta em crias fracas que sobrevivem por pouco dias (SMITH et al., 1962a; SMITH et al., 1962b; WILLIAMS et al., 1964).

Na fase crônica da doença, observa-se metrite com retenção dos anexos fetais e conseqüentemente subfertilidade ou infertilidade com presença ou ausência de corrimento inodoro e hiperemia da mucosa vaginal (TYMONEY et al., 1988; ACHA & SZYFRES, 1986; BATHKE, 1999).

Em machos, pode ocorrer inflamação necrosante do testículo, epidídimo e vesículas seminais, com hiperplasia uni ou bilateral e casos de subfertilidade até infertilidade (OMS, 1986; XAVIER et al., 2009; ROOP et al., 2009).

A bactéria pode acometer as articulações sinoviais, principalmente o carpo e tarso e gerar espondilites torácicas e lombares (OCHOLI et al., 2004; CVETNIC et al., 2005).

2.4 – Diagnóstico

O isolamento é considerado a técnica padrão ouro, sendo o método mais confiável para o diagnóstico individual da brucelose. O material indicado para o isolamento são secreções, conteúdo purulento, conteúdo abomasal de fetos abortados, fluído cefalorraquidiano, pleural, sinovial e ascítico. Entretanto, a complexidade de execução e o elevado custo dificultam o emprego do diagnóstico microbiológico como método de controle em larga escala e o método não apresenta reprodutibilidade (VASCONCELLOS et al., 1987; MANTUR et al., 2006; OIE, 2012). O emprego de técnicas sorológicas representa maior importância no diagnóstico no rebanho, sendo o isolamento usado como técnica complementar à sorologia (ALTON et al., 1988).

O objetivo dos testes sorológicos é detectar a reação entre o antígeno e anticorpo, sendo sua identificação depende do antígeno empregado. No gênero *Brucella* spp. encontram-se dois tipos morfológicos de colônias, as lisas e rugosas. A utilização de um antígeno para as espécies lisas pode levar a reações cruzadas entre estas espécies e da mesma forma pode ocorrer para as espécies rugosas (NIELSEN et al., 1984)

O resultado positivo no teste sorológico em certas situações pode não ser definitivo devido ao LPS-O possuir similaridade com outros microrganismos como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O:157, *Pseudomonas* sp., *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae* (RUIZ, 1954; DIAZ & LEVIUEX, 1972; ALLAN et al., 1976).

Todos os testes sorológicos têm limitações frente às diferentes situações epidemiológicas, especialmente em casos de triagem individual dos animais (GODFROID et al., 2002; NIELSEN et al., 2006). Em locais onde acontece a vacinação contra a brucelose, falsos positivos nos testes são frequentes, devido à reação cruzada com os anticorpos vacinais, caso não seja respeitado o limite mínimo para realização do inquérito sorológico (OIE, 2012).

O desempenho das técnicas se deve a sua capacidade de detecção de IgG1, presente em animais com infecção natural. Testes como ELISAI, ELISAc e FC são os

que apresentam maior capacidade para identificar esta classe de imunoglobulinas (WRIGHT & NIELSEN, 1990).

Diversas são as provas sorológicas usadas no sorodiagnóstico da brucelose bovina, como: Teste de Polarização Fluorescente (FPA), *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou Teste de Rosa Bengala (RBT), Teste do anel do Leite (TAL), Teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT), Teste de 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Teste de Fixação do Complemento (TFC); as cinco últimas são as técnicas oficiais empregadas pelo MAPA (NIELSEN, 2000; BRASIL, 2006).

2.4.1 – Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) ou Teste de Rosa Bengala (RBT)

É um teste de aglutinação realizado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com o Rosa de Bengala, sendo considerado um teste de triagem para o rebanho. Sua sensibilidade é variável de acordo com a temperatura de onde é realizado (ALTON et al., 1988; NIELSEN & DUNCAN, 2000; RUIZ et al., 2005; BRASIL, 2006; OIE, 2012).

A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação positiva nesta prova. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19 e reação cruzada devido a infecção por outros microrganismos, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados (BRASIL, 2006; USDA, 2003; RUIZ et al., 2005; OIE, 2012).

O AAT detecta infecções tardias, sendo, nesse aspecto, superior à prova lenta em tubos, por detectar IgG1 e não IgM, devido ao pH ácido do antígeno utilizado degradar a estrutura da IgM. Raramente as respostas falso-negativas ocorrem e são causadas na maioria dos casos por efeitos pró-zona, quando há formação de complexos solúveis devido ao número de anticorpos ou antígenos em excesso, que pode ser corrigido pela diluição do soro ou realizar nova coleta e teste após 3 a 4 semanas (MORGAN, 1982; STITES, 1991; BUTCH, 2000; USDA, 2003, OIE, 2012).

2.4.2 – Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT) e Teste de 2-Mercaptoetanol (2-ME)

Wright e Smith introduziram a SAT em 1897 e, desde então, este teste é utilizado no diagnóstico da brucelose. Também é chamada de prova lenta devido a leitura dos resultados ser feita em 48 horas. O SAT é realizado em paralelo com o teste do 2-ME para confirmar resultados positivos e negativos em provas de rotina sorológica (STABLEFORTH, 1959; LAMBERT & AMERAULT, 1962; MORGAN, 1967; NICOLETTI, 1967; ALTON, 1977; MORGAN, 1977; NIELSEN & DUNCAN, 2000; CHRISTOPHER et al., 2010).

O SAT é uma prova que detecta tanto IgG e IgM, e o 2-ME apenas IgG pelo fato da solução de 2-mercaptoetanol degradar a configuração pentamérica das IgMs em cinco subunidades não aglutinantes (TYMONEY et al., 1988; BRASIL, 2006).

Ambos são testes quantitativos, pois utilizam a titulação do soro teste. Para a interpretação deve-se comparar os títulos encontrados em cada teste (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Animais que apresentam títulos baixos de IgG podem ser facilmente mal interpretados na técnica de 2-ME. Títulos altos no SAT são considerados confirmatórios quando há correspondência com sintomatologia clínica. Portanto, a realização em paralelo dos testes é mais adequada e sensível nos casos de animais cronicamente infectados (CHRISTOPHER et al., 2010).

2.4.3 – Teste de Polarização Fluorescente (FPA)

O teste de polarização fluorescente é uma técnica simples, de fácil e rápida execução, e é uma alternativa valiosa no diagnóstico. A sua leitura não é afetada pela hemólise no soro e pode ser utilizado a campo por possuir um equipamento portátil. O antígeno utilizado é preparado com o LPS-O de *B. abortus*, conjugado ao

isotiocianato de fluoresceína (NIELSEN et al, 1996; SAMARTINO et al., 1999; NIELSEN et al., 2001; OIE, 2012).

A prova se fundamenta na comparação de velocidade dos movimentos aleatórios das moléculas em solução a partir da polarização da luz. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela. Quando o soro do animal possui anticorpos específicos, ocorre a ligação antígeno-anticorpo e esse complexo sendo mais pesado, diminui sua rotação, resultando em uma alta polarização da luz. Não havendo anticorpos, conseqüentemente não ocorre formação do complexo e a molécula antigênica gira mais rápido, resultando em uma baixa polarização da luz. Esta medida é mensurada por um analisador de polarização de fluorescência (NIELSEN et al., 1996; DAJER et al., 1999; SAMARTINO et al., 1999; NIELSEN et al., 2005; BRASIL, 2006; BRASIL, 2016).

A sensibilidade e especificidade do FPA frente ao ELISA competitivo são bem semelhantes e a especificidade dos bovinos recentemente vacinados com a vacina B19 chega a 99% (NIELSEN et al., 1996; NIELSEN et al., 2000; LUCERO et al., 2003). Entretanto, segundo a OIE, a especificidade frente aos falsos positivos reativos na sorologia é desconhecida e necessita de mais estudos de padronização (OIE, 2012).

2.4.4 – Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ELISA é uma reação sorológica baseada no uso de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, na qual o complexo resultante possui atividade imunológica e enzimática. O produto formado pode ser mensurado com o auxílio de um fotolorímetro ou de um espectrofotômetro (MADRUGA et al., 2001). É um dos testes mais multifacetados entre os métodos de diagnóstico, possuindo diversas formas de execução e finalidades. Nos últimos vinte anos, o ELISA tem sido empregado no diagnóstico de muitas enfermidades infecciosas, entre elas a brucelose, na qual essa técnica vem se tornando bastante usual (MOLNÁR et al., 2002; SMITS & KADRI, 2005).

A técnica se baseia na detecção de anticorpos anti-brucelas lisas e o ponto de corte deve ser ajustado de acordo com a situação epidemiológica local. É um teste muito sensível e específico e é recomendado pela OIE (2012) como teste confirmatório no diagnóstico da brucelose, assim como a FC. Entretanto, segundo Neubauer et al. (2005), sua especificidade varia com o antígeno e anticorpo utilizado. É um teste rápido, prático e com possibilidade de automação, contudo como desvantagem apresenta um elevado custo (NEUBAUER et al., 2005; SMITS & KADRI, 2005; BRASIL, 2006; TELES et al., 2012).

2.4.5 – Teste de Fixação do Complemento (TFC)

O TFC foi descrito inicialmente por M'Fadyean e Stckman em 1909 como teste diagnóstico, porém pela dificuldade de realização e aparecimento da atividade anti-complementar do soro não foi muito utilizado. Contudo, há relatos que o TFC pode classificar melhor os animais do que o SAT (HILL, 1963; M'FADYEAN & STCKMAN, 1909). Porém, atualmente este teste é empregado em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicação. É o teste de referência recomendado pela OIE para o trânsito internacional de animais e sua sensibilidade e especificidade estimada varia entre 92,9 – 93,3% e 95,5 – 100% (STEMSHORN et al, 1985; DOHOO et al, 1986; MAC MILLAN, 1990; NIELSEN et al, 1999; OIE, 2012).

Apesar do FC detectar tanto IgG1 como IgM para o isotipo IgM são requeridas grades quantidades para que mesmo fixe o complemento, deste modo, pode-se dizer que o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento do cobaio e, portanto, animais que possuem altos títulos de IgG1 permanecem por período maiores como positivo neste teste (HILL, 1963; CHAPPEL, 1989; MAC MILLAN, 1990; NIELSEN & DUNCAN, 2000; BRASIL, 2006; GODFROID et al, 2010).

O TFC é um teste utilizado ao longo dos anos para diferenciar animais vacinados de animais com infecção natural e de outras reações inespecíficas, pois esta técnica sofre menos a influência do IgG1 vacinal do que da infecção natural, diminuindo o número de falsos positivos (BURKI, 1963; JONES et al., 1963; HILL,

1963; MYLREA & FRASER, 1976; ALTON et al, 1978; SUTHERLAND, 1980; MATHIAS et al, 2001). Todavia, é um teste trabalhoso e complexo que exige pessoal treinado e laboratório bem equipado (BRASIL, 2006).

2.4.6 - Western Blotting (WB)

Western Blotting é uma técnica imunoproteômica, ou seja, usada para detectar proteínas e foi descrita primeiramente por Towbin et al. (1979) e atualmente ainda é uma técnica amplamente utilizada. Ao longo do tempo sofreu modificações quanto a sua utilização, como o uso na detecção de múltiplos anticorpos, advindas de pequenas amostras de soro (TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981; LEE, 2007; KAUFMANN et al., 1987).

Trata-se de uma técnica bastante sensível e específica quando utilizada com finalidade sorológica (ELSCHNER et al., 2011); concomitantemente há a necessidade atual de utilização de testes mais sensíveis e específicos com a utilização de proteínas imunológicas como antígeno (WARETH et al., 2014). Como o teste detecta a interação antígeno-anticorpo e, conseqüentemente, a detecção de proteínas imuno-específicas, tornou-se uma ferramenta para a tomada de decisões e interpretações a respeito do resultado muito mais eficiente (KIM et al., 2014).

Wareth et al. (2014) identificaram anticorpos específicos contra 4 tipos de proteínas imuno-específicas presentes na *B. abortus* e uma proteína na *B. melitensis* e assim, sugerem o uso dessas proteínas nos testes sorológicos como possível meio de identificação da espécie de *Brucella*. Manat et al. (2016) caracterizaram a proteína externa da membrana 28 (OMP28) como principal proteína imunodominante, possuindo emprego antigênico em potencial no sorodiagnóstico da brucelose bovina. Outros autores ainda citam o uso do *Western Blotting* para o diagnóstico da brucelose, porém sem resultados satisfatórios e aplicáveis, devido entre outros fatores, ao aparecimento de reações cruzadas do soro de animais infectados com *Y. enterocolitica* O:9 ou *E. coli* O:157:H7 (KO, 2012; OSPINA-FLÓREZ et al., 2014; KIM et al., 2014).

2.5 – Controle e Profilaxia

As medidas de controle da brucelose baseiam-se no conhecimento da epidemiologia e da população a serem aplicadas. De modo geral as medidas de controle se dão por meio de programas de desinfecção de instalações, separação de baias de parição, sacrifício dos animais positivos nos testes sorológicos, controle dos animais introduzidos na propriedade e vacinação (GODFROID & KASBOHRER, 2002; BRASIL, 2006).

A brucelose é uma das poucas doenças que possui vacina bacteriana viva atenuada eficiente (COTTON et al., 1933; ELBERG & MEYER, 1958). Atualmente existem duas vacinas disponíveis no Brasil. A produzida com a cepa B19 indutora de anticorpos aglutinantes e a RB51 que não induz anticorpos aglutinantes, porém ambas atuam induzindo boa imunidade celular (BRASIL, 2006).

A vacina B19 foi descoberta em 1923 partir de uma amostra da *B. abortus* lisa que passou por um processo espontâneo de atenuação, possui baixa virulência e serve para a proteção de animais não infectados em locais onde há animais infectados com eficácia estimada em aproximadamente 70% (BUCK, 1930; LUBROTH et al., 2007). Devido à alta produção e persistência de anticorpos no animal vacinado, é possível detectá-los no leite e se for usada em vacas prenhas pode levar ao aborto e no macho, o aparecimento de orquite (STEVENS et al., 1994). Não é possível distinguir por meio dos testes sorológicos os animais vacinados com a B19 daqueles naturalmente infectados; deve-se aguardar um tempo mínimo após vacinação para a realização dos testes; a vacina é virulenta para humanos representando um risco biológico quando de sua aplicação (YANG et al., 2013).

Já a vacina RB51 é um mutante vivo bruto estável e rugoso de *B. abortus* (cepa 2308) no meio contendo os antibióticos penicilina e rifampicina. Pelo fato dessa vacina ser obtida de uma cepa rugosa (LPS-O ausente), não induz a formação de anticorpos detectáveis nos testes sorológicos convencionais, portanto animais vacinados com a RB51 são distinguíveis sorologicamente de animais que apresentam infecção natural (SCHURIG et al., 1991; RADOSTITS et al., 2002; MORIYÓN et al., 2004). É uma vacina relativamente segura por não causar aborto em fêmeas prenhas ou infecção fetal, quando comparada à B19, porém produz uma proteção similar (OLSEN, 2000;

YANG et al., 2013). Assim como a B19, esta também é uma vacina virulenta para humanos (ZAKIA et al., 2016).

O MAPA recomenda a vacinação com a B19 de novilhas entre 3 e 8 meses de idade, porém não é recomendada para machos e fêmeas prenhas. Já a vacina RB51 deve ser usada de forma estratégica em fêmeas adultas. Novilhas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com a B19 só deverão sofrer investigação sorológica após 24 meses de idade (BRASIL, 2006).

3 – Objetivos

3.1 – Geral

- Desenvolver e padronizar uma técnica de *Western Blotting* para o diagnóstico da brucelose bovina.

3.2 – Específicos

- Produzir um antígeno aplicável ao diagnóstico da brucelose bovina para uso na técnica de *Western Blotting*;
- Analisar a sensibilidade e especificidade da técnica de *Western Blotting* no diagnóstico da brucelose bovina;
- Estudar a concordância entre as técnicas indiretas de diagnóstico da brucelose bovina.

4 – Referências

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Brucellosis. In: ACHA, P.N. (Ed.). **Zoonoses y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud (Publicación Científica 503), p. 14-35, 1986.

ALHAJI, N.B.; WUNGAKB, Y.S.; BERTU, W.J. Serological survey of bovine brucellosis in Fulani nomadic cattle breeds (*Bos indicus*) of North-central Nigeria: Potential risk factors and zoonotic implications. **Acta Tropica**, v. 153, p. 28–35, 2016.

ALLAN, G.S.; CHAPPEL, R.J.; WILLIAMSON, P.; MCNAUGHT, D.J. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **The Journal of Hygiene**, v. 76, p. 287, 1976.

ALTON, G.G. Development and evaluation of serological tests. In: CRAWFORD, R.P. AND HILDAGO, R.J. **Bovine Brucellosis: International Symposium**, Ed. Texas A&M University Press, College Station, v. 61, 1977.

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

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis. An evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 5, p. 57-63, 1978.

ANKA, M.S.; HASSAN, L.; KHAIRANI-BEJO, S.; ZAINAL, M.A.; MOHAMAD, R.B.; SALLEH, A.; ADZHAR, A. A Case-Control Study of Risk Factors for Bovine Brucellosis Seropositivity in Peninsular Malaysia. **PLoS One**, v. 9, p. 9, 2014.

ASGEDOM, H.; DAMENA, D.; DUGUMA, R. Seroprevalence of bovine brucellosis and associated risk factors in and around Alage district, Ethiopia. **Springer Plus**, v. 5 p. 851, 2016.

AZNAR, M. N.; LINARES, F. J.; COSENTINO, B.; SAGO, A.; LA SALA, L.; LEÓN, E.; DUFFY S.; PEREZ, A. Prevalence and spatial distribution of bovine brucellosis in San Luis and La Pampa, Argentina. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 209, 2015.

BANG, B. The etiology of epizootic abortion. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.10, p.125, 1897.

BATHKE, W. Brucelose. In: BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1ª edição, p. 163-188, 1999.

BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine Brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, v. 2, p.1053-1066, 1994.

BORBA, M.R.; STEVENSON, M.A.; GONÇALVES, V.S.; NETO, J.S.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; TELLES, E.O.; SANTANA, S.S.; FERREIRA, J.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.; DIAS, R.A. Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhão State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine** v.110, n. 2, p.169-176, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa número 19 de 10 de outubro de 2016**. Brasília, 2016.

BUCK, J.M., Studies of vaccination during calfhood to prevent bovine infectious abortion. **Journal of Agricultural Research**, v.41, p.667–689, 1930.

BURKI, F. Emploi de l' épreuve déviation du complément pour distinguer les animaux infectés de Brucellose de ceux qui ont été vaccinés contre la maladie. **Bulletin - Office International des Epizooties**, v.60, p.419, 1963.

BURNETTE, W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v.112, p.195–203, 1981.

BUTCH, A.W. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon. **Clinical Chemistry**, v.46, n.10, p. 1719-1721, 2000.

CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; IANNACCONE, M.; ROPERTO, R.; MARABELLI, R.; ROPERTO, F.; IANNELLI, D. Heterogeneous shedding of *Brucella*

abortus in milk and its effect on the control of animal brucellosis. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p. 2041-2047, 2009.

CARTER, G.R. ; CHENGAPPA, M.M. *Brucella*. In: CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. (Eds.). **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4^a edição, Philadelphia: London, p.196- 201, 1991.

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

CARVALHO NETA, A.V.; STYNEN, A.P.; PAIXÃO, T.A.; MIRANDA, K.L.; SILVA, F.L.; ROUX, C.M.; TSOLIS, R.M.; EVERTS, R.E.; LEWIN, H.A.; ADAMS, L.G.; CARVALHO, A.F.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. **Infection and Immunity**, v.76, n.5, p.1897-1907, 2008.

CHAND, P.; SADANA, J.R.; MALHOTRA, A.K. Epididymo-orchitis caused by *Brucella melitensis* in breeding rams in India. **Veterinary Record**, v.150, p.84–85, 2002.

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

CHIEBAO, D.P.; VALADAS, S.Y.; MINERVINO, A.H.; CASTRO, V.; ROMALDINI, A.H.; CALHAU, A.S.; DE SOUZA, R.A.; GENNARI, S.M.; KEID, L.B.; SOARES, R.M. Variables Associated with Infections of Cattle by *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. and *Neospora* spp. in Amazon Region in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.62, n.5, p.30-36, 2015.

CORSETTI, P.P.; ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B.; AZEVEDO, V.; SILVA, T.M.; TEIXEIRA, H.C.; FARIA, A.C.; OLIVEIRA, S.C. Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. **PLoS One**, v. 8, n.9, p.e74729, 2013.

COSTA, L.F.; PESSOA, M.S.; GUIMARÃES, L.B.; FARIA, A.K.; MORÃO, R.P.; MOL, J.P.; GARCIA, L.N.; ALMEIDA, A.C.; GOUVEIA, A.M.; SILVA, M.X.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. **BMC Research Notes**, v.26, n.9, p.190, 2016.

COTTON, W.E.; BUCK, J.M.; SMITH, H.E. Efficacy and safety of abortion vaccines prepared from *Brucella abortus* strains of different degrees of virulence. **Journal of Agricultural Research**, v.46, p.291–314, 1933.

CULTUER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. Brucellosis- new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1270-81, 2005.

CVETNIC, Z.; SPICIC, S.; CURIC, S. et al. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. **Veterinary Record**, v.156, p.584-585, 2005.

DA SILVA, J.B.; RANGEL, C.P.; FONSECA, A.H.; MORAIS, E.; VINHOTE, W.M.; SILVA LIMA, D.H.; SILVA E SILVA, N.; BARBOSA, J.D. Serological survey and risk factors for brucellosis in water buffaloes in the state of Pará, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, n.2, p.385-389, 2014.

DE ALMEIDA, L.A.; CARVALHO, N.B.; OLIVEIRA, F.S.; LACERDA, T.L.; VASCONCELOS, A.C.; NOGUEIRA, L.; BAFICA, A.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, S.C. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS One**, v.6, n.8, p.e23135, 2011.

DE ALMEIDA, L.A.; MACEDO, G.C., MARINHO, F.A., GOMES, M.T., CORSETTI, P.P., SILVA, A.M., CASSATARO, J., GIAMBARTOLOMEI, G.H., OLIVEIRA, S.C. Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, v.81, n.5, p.1654-1662, 2013.

DAJER, A.; LUNA-MARTÍNEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIÉRREZ, E.; PEÑA, G.; GURRÍA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, p. 67-73, 1999.

DOHOO, I.R., WRIGTH, P.F, RUCKERBAUER, R., SAMAGH, B.S., ROBERTSON, F.J., FORBES, L.B. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, p.485-493, 1986.

DORNELES, E.M., DE FARIA, A.P., PAULETTI, R.B., SANTANA, J.A., CALDEIRA, G.A., HEINEMANN, M.B., TITZE-DE-ALMEIDA, R., LAGE, A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). **Vaccine**, v.31, n.42, p.4856-4859, 2013.

DORNELES, E.M., LIMA, G.K., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ARAÚJO, M.S., MARTINS-FILHO, O.A., SRIRANGANATHAN, N., AL QUBLAN, H., HEINEMANN,

M.B., LAGE, A.P. Immune Response of Calves Vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and Revaccinated with RB51. **PLoS One**, v.10, n.9, p.e0136696, 2015.

DORNELES, E.M., SANTANA, J.A., ALVES, T.M., PAULETTI, R.B., MOL, J.P., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16). **BMC Microbiology**, v.14, p.186, 2014.

DOS SANTOS, L.S., DA SILVA MOL, J.P., DE MACEDO, A.A., SILVA, A.P., DOS SANTOS RIBEIRO, D.L., SANTOS, R.L., DA PAIXÃO, T.A., DE CARVALHO NETA, A.V. Transcription of non-classic major histocompatibility complex (MHC) class I in the bovine placenta throughout gestation and after *Brucella abortus* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.167, n.3-4, p.166-170, 2015.

ELBERG, S.S., MEYER, K.F. Caprine immunization against brucellosis. A summary of experiments on the isolation, properties and behavior of a vaccine strain. **Bulletin of the World Health Organization**, v.19, p.711–724, 1958.

ELSCHNER, M. C. SCHOLZ, H. C; MELZER, F.; SAQIB, M.; MARTEN, P.; RASSBACH, A.; DIETZSCH, M.; SCHMOOCK, G.; SANTANA, V. L. DE A.; SOUZA, M. M. A.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; NEUBAUER, H. Use of Western Blot Technique for the Serodiagnosis of Glanders. **BMC Veterinary Research**, v.7, n.4, p. 1-6, 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org> Acesso em: 13 outubro 2016.

FURTADO, M.M., GENNARI, S.M., IKUTA, C.Y., JÁCOMO, A.T., DE MORAIS, Z.M., PENA, H.F., PORFÍRIO, G.E., SILVEIRA, L., SOLLMANN, R., DE SOUZA, G.O., TÔRRES, N.M., FERREIRA NETO, J.S. Serosurvey of Smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in Free-Ranging Jaguars (*Panthera onca*) and Domestic Animals from Brazil. **PLoS One**, v.10, n.11, p.e0143816, 2015.

GENERAL DISEASE INFORMATION SHEETS (GDIS) – BRUCELLOSIS. In: **World Organization for Animal Health (OIE)**. 2016. Disponível em < <http://www.oie.int/doc/ged/D13938.PDF>> Acesso em: 1 agosto 2016.

GODFROID J, KASBOHRER A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1-4, p.135-145, 2002.

GODFROID, J., NIELSEN, K., SAEGERMAN, C. Diagnosis of Brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian Medical Journal**, v.51, p.296-305, 2010.

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

GODFROID, J., SCHOLZ, H.C., BARBIER, T., NICOLAS, C., WATTIAU, P., FRETIN, D., WHATMORE, A.M., CLOECKAERT, A., BLASCO, J.M., MORIYON, I., SAEGERMAN, C., MUMA, J.B., DAHOUK, S.A., NEUBAUER, H., LETESSON, J.J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**, v.102, p.118–131, 2011.

GOMES, M.T., CAMPOS, P.C., OLIVEIRA, F.S., CORSETTI, P.P., BORTOLUCI, K.R., CUNHA, L.D., ZAMBONI, D.S., OLIVEIRA, S.C. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection. **The Journal of Immunology**, v.190, n.7, p.3629-3638, 2013.

GONÇALVES, D.D., TELES, P.S., DOS REIS, C.R., LOPES, F.M., FREIRE, R.L., NAVARRO, I.T., ALVES, L.A., MULLER, E.E., DE FREITAS, J.C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.135-140, 2006.

GRASSO-PAULIN, L.M.S. O combate à brucelose bovina. 2000. 112p. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo.

HARLOW, E., LANE, D. Immunoblotting. In: (Eds.). **Using Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York, p. 305–306, 1998.

HILL, W.K.W. Standardization of Complement fixation test for brucellosis. **Bulletin - Office International des Epizooties**, v.60, p.401, 1963.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo dos rebanhos por tipos de rebanhos, 2009**. Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&vcodigo=PPM01&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho#P1>> Acesso em: 15 out. 2014.

JONES, L.M., HENDRICKS, J.B., BERMAN, D.T. The standardization and use of complement fixation test for diagnosis of bovine brucellosis, with a review of literature. **American Journal of Veterinary Research**, v.24, p.1143, 1963.

JUNQUEIRA JUNIOR, D.G., ROSINHA, G.M., CARVALHO, C.E., OLIVEIRA, C.E., SANCHES, C.C., LIMA-RIBEIRO, A.M. Detection of *Brucella* spp. DNA in the semen of seronegative bulls by polymerase chain reaction. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, n.4, p.376-377, 2013.

JUNQUEIRA, D.G..J.R., DORNELES, E.M., GONÇALVES, V.S., SANTANA, J.A., ALMEIDA, V.M., NICOLINO, R.R., SILVA, M.X., MOTA, A.L., VELOSO, F.P., STYNEN, A.P., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P. Brucellosis in working equines of cattle farms from Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.12, n.3-4, p.380-385, 2015.

KABI, F., MUWANIKA, V., MASEMBE, C. Spatial distribution of Brucella antibodies with reference to indigenous cattle populations among contrasting agro-ecological zones of Uganda. **Preventive Veterinary Medicine**, v.121, p.56–63, 2015.

KAUFMANN, S.H. EWING, C.M., SHAPER, J.H. The erasable Western blot, **Analytical Biochemistry**, v.161, p.89-95, 1987.

KIM, J.Y., SUNG, S.R., LEE, K., LEE, H.K., KANG, S.I. LEE, J.J., JUNG, S.C., PARK, Y.H., HER, M. Immunoproteomics of *Brucella abortus* RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.160, p.218–224, 2014.

KO, J., SPLITTER, G.A. Molecular host interaction in brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.65-78, 2003.

KO, K.Y., KIM, J.W., HER, M., KANG, S.I., JUNG, S.C., CHO, D.H., KIM, J.Y. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.374–380, 2012.

LAMBERT, G., AMERAULT, T.E. Comparative study of three serological tests for detecting the response in cattle to virulent *Brucella abortus*, **American Journal of Veterinary Research**, v.23, p.529, 1962.

LAPAQUE, N., MORIYON, I., MORENO, E., GROVEL, J.P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.60-66, 2005.

LAPAQUE, N., TAKEUCHI, O., CORRALES, F., AKIRA, S., MORIYON, I., HOWARD, J.C., AND GORVEL, J.P. Differential inductions of TNF-alpha and IIGP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. **Cellular Microbiology**, v.8, p.401-413, 2006.

LEE, C. Western blotting. **Methods in Molecular Biology**, v.362, p. 391-399, 2007.

LILENBAUM, W., DE SOUZA, G.N., RISTOW, P., MOREIRA, M.C., FRÁGUAS, S., CARDOSO, V.D.A.S., OELEMANN, W.M. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Journal**, v.173(2), p.408-412, 2007.

LUBROTH, J., RWEYEMAMU, M.M., VILJOEN, G., DIALLO, A., DUNGU, B., AMANFU, W., Veterinary vaccines and their use in developing countries. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.26, p.179-201, 2007.

LUCERO, N.E., ESCOBAR, G.I., AYALA, S.M., SILVA, P.N. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.883-887, 2003.

M'FADYEAN & STCKMAN. Part I. Epizootic abortion in cattle. In: **Report of the Departmental Committee to Inquire into Epizootic Abortion., (Cd. 4742)**. Appendix to Part I (Cd 4863), Bordeaux Agriculture and Fisheries, 1909.

MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, JR. (Ed). **Animal brucellosis**. USA: CRC Press. p.155-300, 1990.

MACEDO, A.A., COSTA, E.A., SILVA, A.P., PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.151, n.3-4, p.294-302, 2013.

MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em medicina veterinária. **Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, p.360, 2001.

MANAT, Y., SHUSTOV, A.V., EVTEHOVA, E., ESKENDIROVA, S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species. **Open Veterinary Journal**, v. 6, n.2, p.71-77, 2016.

MANTUR, B.G.; BIRADAR, M.S.; BIDRI, C.; MALLANA, S.; VERRAPPA, K.; KARIHOLU, P.; PATIL, S.B.; MANGALGI, S.S. Protean clinical manifestation & diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years experience in an endemic area. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.897-903, 2006.

MATHIAS, L.A., CHAVES, L.F., CHEN, A.A., GIRIO, R.J.S., VALERIO NETO, W. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soro aglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.139-142, 2001.

MEGID, J., MATHIAS, L. A. Brucelose. In: MEGID, J., RIBEIROS, M. G., MATHIAS, L. A. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1ª edição. Rocca, Rio de Janeiro – RJ, cap. 3, p. 21-52, 2016.

METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. BRUCELLOSIS. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. (Eds.). **Handbook of zoonoses. section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic**. 2ª edição. Raton: CRC Press, p.9-39, 1994.

MINHARRO, S., SILVA MOL, J.P., DORNELES, E.M., PAULETTI, R.;B., NEUBAUER, H., MELZER, F., POESTER, F.P., DASSO, M.G., PINHEIRO, E.S., SOARES FILHO, P.M., SANTOS, R.L., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P. Biotyping and genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* isolated from cattle in Brazil, 1977 to 2008. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e81152, 2013.

MIRANDA, K.L., POESTER, F.P., DORNELES, E.M., RESENDE, T.M., VAZ, A.K., FERRAZ, S.M., LAGE, A.P. *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. **Acta Tropica**, v.160, p.58-61, 2016.

MIRANDA, K.L., POESTER, F.P., MINHARRO, S., DORNELES, E.M., STYNEN, A.P., LAGE, A.P. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. **Vaccine**, v.31, n.29, p.3014-3018, 2013.

MOL, J.P., COSTA, E.A., CARVALHO, A.F., SUN, Y.H., TSOLIS, R.M., PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L. Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, $\Delta virB2$ or $\Delta btpB$ *Brucella abortus* infection. **PLoS One**, v.9, p.e108606, 2014.

MOL, J.P., PIRES, S.F., CHAPEAUROUGE, A.D., PERALES, J., SANTOS, R.L., ANDRADE, H.M., LAGE, A.P. Proteomic Profile of *Brucella abortus*-Infected Bovine Chorioallantoic Membrane Explants. **PLoS One**, v.11, n.4, p.e0154209, 2016.

MOLINA, C.V., CATÃO-DIAS, J.L., FERREIRA NETO, J.S., VASCONCELLOS, S.A., GENNARI, S.M., DO VALLE, R.D.E.L.R., DE SOUZA, G.O., DE MORAIS, Z.M., VITALIANO, S.N., STREFEZZI, R.D.E.F., BUENO, M.G. Sero-epidemiological survey for brucellosis, leptospirosis, and toxoplasmosis in free-ranging *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata* from São Paulo State, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v.43, n.3, p.197-201, 2014.

MORGAN, W. J. B. The serological diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Record**, v.80, p.612, 1967.

MORGAN, W.J.B. *Brucella abortus* (review). In: BLOBEL, H., SCHLIESSER, T. **Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren**. Ed. Fischer, Frankfurt am Main, v.4.p.53, 1982.

MORGAN, W.J.B. The diagnosis of *Brucella abortus* infection in Britain. In: CRAWFORD, R.P.; HILDAGO, R. J. **Bovine Brucellosis: International Symposium**. Texas A&M University Press, College Station, v.21, 1977.

MORIYÓN, I., GRILLÓ, M.J., MONREAL, D., GONZÁLEZ, D., MARÍN, C., LÓPEZ-GOÑI, I., MAINAR-JAIME, R.C., MORENO, E., BLASCO, J.M., Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. **Veterinary Research**, v.35, p.1–38, 2004.

MUGIZI, D.R., BOQVIST, S., NASINYAMA, G.W., WAISWA, C., IKWAP, K., ROCK, K., LINDAHL, E., MAGNUSSON, U., ERUME, J. Prevalence of and factors associated with *Brucella* sero-positivity in cattle in urban and peri-urban Gulu and Soroti towns of Uganda. The **Journal of Veterinary Medical Science**, v.77, n.5, p.557–564, 2015.

MUÑOZ, P.M., DE MIGUEL, M.J., GRILLÓ, M.J., MARÍN, C.M., BARBERÁN, M., BLASCO, J.M. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. **Vaccine**, v.26, p.2562–2569, 2008.

MUSALLAM, I.I., ABO-SHEHADAB, M., OMARC, M., GUITIAN, J. Cross-sectional study of brucellosis in Jordan: Prevalence, riskfactors and spatial distribution in small ruminants and cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.118, p.387–396, 2015.

MYLREA, P.J., FRASER, G.C. The use of supplementary tests in serological diagnosis of bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v.52, p.261, 1976.

NARDI, G.J., RIBEIRO, M.G., JORGE, A.M., MEGID, J., SILVA, L.M. Serological profile of buffalo (*Bubalus bubalis*) female calves vaccinated with standard *Brucella abortus* strain 19 vaccine using rose bengal, 2-mercaptoethanol and complement fixation tests. **Biologicals**, v.40, n.2, p.158-161, 2012.

NAVES, J.H., REZENDE, L.M., RAMOS, G.C., SOARES, P.M., TAVARES, T.C., FRANÇA, A.M., NEVES, S.M., SILVA, N.A., LIMA-RIBEIRO, A.M. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.2, p.283-287, 2012.

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D.; ZACHARIA, R.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; SCHOLZ, H. C. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* Infections in Horses. State-of-art and perspectives. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.52, p. 201-205, 2005.

NICOLETTI, P. Utilization of the card test in brucellosis eradication. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v151, p.1778, 1967.

NIELSEN, K., GALL, D., SMITH, P., VIGLIOCCO, A., PEREZ, B., SAMARTINO, L.E., NICOLETTI, P., DAGER, A., ELZER, P., ENRIGHT, F. Validation of fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. **Veterinary Microbiology**. n.68, p.245-253, 1999.

NIELSEN, K., LIN, M., GALL, D., JOLLEY, M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody of *Brucella abortus*. **Methods**, v.22, p.71-76, 2000.

NIELSEN, K., SMITH, P., YU, W., NICOLETTI, P., ELZER, P., ROBLES, C., BERMUDEZ, R., RENTERIA, T., MORENO, F., RUIZ, A., MASSENGILL, C., MUENKS, Q., JURGERSEN, G., TOLLERSRUD, T., SAMARTINO, L., CONDE, S., FORBES, L., PEREZ, B., ROJAS, X., MINOS, A. Towards a single screening test for brucellosis. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, p. 1027–1038, 2005.

NIELSEN K., SMITH P., YU W., NICOLETTI P., JURGERSEN G., STACK J. & GODFROID J. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* O:9 in cattle and pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.69–78, 2006.

NIELSEN, K., GALL, D., JOLLEY, M., LEISHMAN, G., BALSEVICIUS, S., SMITH, P., NICOLETTI, P., THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **Journal of Immunological Methods**, v.195, p.161-168, 1996.

NIELSEN, K., GALL, D., SMITH, P., KELLY, W., YEO, J., KENNY, K., HENEGHAN, T., MAHER, P., O'CONNOR, J., WALSH, B., CARROLL, J., ROJAS, X., ROJAS, F., PEREZ, F., WULFF, O., BUFFONI, L., SALUSTIO, E., GREGORET, R., SAMARTINO, L., DAJER, A., LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.21, n.80, p.163-170, 2001.

NIELSEN, K., HECK, F., WAGNER, G., STTILER, J. ROSENBAUM, B., PUGH, R., FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotypes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p.197, 1984.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 2000.

OCHOLI, R.A.; BERTU, W.J.; KWAGA, J.K.P. et al. Carpal bursitis associated with *Brucella abortus* in a horse in Nigeria. **Veterinary Record**, v.155, p.566-567, 2004.

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal. Bovine Brucellosis. In: **OIE - Manual de animais terrestres**, capítulo 2.4.3, p. 616-650, 2012.

OLIVEIRA, F.S., CARVALHO, N.B., BRANDÃO, A.P., GOMES, M.T., DE ALMEIDA, L.A., OLIVEIRA, S.C. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of *Brucella abortus* infection. **Infection and Immunity**, v.79, n.11, p.4688-4695, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, E.F., PINHEIRO, J.W., SOUZA, M.M., SANTANA, V.L., SILVA, J.C., MOTA, R.A., SÁ, F.B. Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.43, n.2, p384-387, 2012.

OLSEN, S.C. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. **Veterinary Therapeutics**, v.1, n. 3, p.183–191, 2000.

ONUMA, S.S., KANTEK, D.L., CRAWSHAW JÚNIOR, P.G., MORATO, R.G., MAY-JÚNIOR, J.A., MORAIS, Z.M., FERREIRA NETO, J.S., AGUIAR, D.M. Detection of

Leptospira spp. and *Brucella abortus* antibodies in free-living jaguars (*Panthera onca*) in two protected areas of northern Pantanal, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.7, n.2, p.177-180, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. **OMS, Série de informes técnicos, 740**. Genebra: p.149, 1986.

PAIXÃO, T.A., POESTER, F.P., CARVALHO NETA, A.V., BORGES, A.M., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. NRAMP1 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. **Infection and Immunity**, v.75, n.5, p.2493-2499, 2007.

PAJUABA, A.C., SILVA, D.A., MINEO, J.R. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays and IgG avidity assays using a protein A-peroxidase conjugate for serological distinction between *Brucella abortus* S19-vaccinated and -infected cows. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.4, p.588-595, 2010.

PAJUABA, A.C.A.M., SILVA, D.A.O., KARINE C. ALMEIDA, K.C.A., CUNHA-JUNIOR, J.P., PIROVANI, C.P., CAMILLO, L.R., MINEO, J.R. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle. **Proteomics**, v.12, p.820–831, 2012.

POESTER, F.P., GONÇALVES, V.S., PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L., OLSEN, S.C., SCHURIG, G.G., LAGE, A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, v.24, n.25, p.5327-5334, 2006.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 778-791, 2002.

RAMOS, T.R., PINHEIRO JUNIOR, J.W., MOURA SOBRINHO, P.A., SANTANA, V.L., GUERRA, N.R., DE MELO, L.E., MOTA, R.A. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the micro region of Araguaína, Tocantins. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.133-138, 2008.

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; ALMEIDA, C.A.S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.83-92, 2008.

RODRIGUES, A.L., SILVA, S.K., PINTO, B.L., SILVA, J.B., TUPINAMBÁS, U. Outbreak of laboratory-acquired *Brucella abortus* in Brazil: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46(6), p.791-794, 2013.

ROOP, R.M.2, GAINES, J.M., ANDERSON, E.S., CASWELL, C.C., MARTIN, D.W. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. **Medical Microbiology and Immunology**, v.198, p. 221–238, 2009.

RUIZ, C.M. A practical method for routine blood culture in brucellosis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.86, p.154-155, 1954.

RUIZ, J.D., SANCHEZ, G., REHUERA, J.M., MARTIN, L., LOPEZ, P., COLMENEW, J.D. Rose Bengal test diagnosis of human brucellosis in emergency department in endemic areas. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.221-225, 2005.

SALES IDOS, S., FOLLY, M.M., GARCIA, L.N., RAMOS, T.M., DA SILVA, M.C., PEREIRA, M.M. *Leptospira* and *Brucella* antibodies in collared anteaters (*Tamandua tetradactyla*) in Brazilian zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.43, n.4, p.739-743, 2012.

SAMARTINO, L., GREGORET, R., GALL, D., NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v.20, n.3, p.115-120, 1999.

SCHOLZ, H.C., REVILLA-FERNÁNDEZ, S., AL DAHOUK, S., HAMMERL, J.A., ZYGMUNT, M.S., CLOECKAERT, A., KOYLASS, M., WHATMORE, A.M., BLOM, J., VERGNAUD, G., WITTE, A., AISTLEITNER, K., HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66. p. 2090-2098. 2016.

SCHOLZ, H.C., VERGNAUD, G. Molecular characterization of *Brucella* species. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.32, n.1, p.149–162, 2013.

SCHURIG, G.G., ROOP, R.M.I.I., BAGCHI, T., BOYLE, S., BUHRMAN, D., SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. **Veterinary Microbiology**, v.28, p.171–188, 1991.

SHAW, C.E., ZHENG, J. Western immunoblot analysis. **Methods in Molecular Biology**, v.105, p.295–306, 1998.

SILVA, T.M., COSTA, E.A., PAIXÃO, T.A., TSOLIS, R.M., SANTOS, R.L. Laboratory animal models for brucellosis research. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, p.518323, 2011.

SMITH, H., KEPPIE, J., PEARCE, J.H., WIITT, K. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. IV. Immunogenic products from *Brucella abortus* grown in vivo and in vitro. **British Journal of Experimental Pathology**, v.43, n. 5, p.538–548, 1962a.

SMITH, H., WILLIAMS, A.E., PEARCE, J.H., KEPPIE, J., HARRIS-SMITH, P.W., FITZ-GEORGE, R.B., WITT, K. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. **Nature**. v.193, p.47–49, 1962b.

SMITS, H.L., KADRI, S.M. Brucellosis in India: A deceptive infectious disease. **The Indian Journal of Medical Research**, v.122, n. 5, p.375-384, 2005.

STABLEFORTH, A. W. Brucellosis. In: STABLEFORTH, A. W.; GALLOWAY, I. A. **Infectious Disease of Animals: Diseases Due to Bacteria**. Ed. Butterworths, London, v.53, 1959.

STEMSHORN, B.W., FORBES, L.B., EAGLESOME, M.D., NIELSEN, K.H., ROBERTSON, F.J., SAMAGH, B.S. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v.9, p.391-394. 1985.

STEVENS, M.G., HENNAGER, S.G., OLSEN, S.C., CHEVILLE, N.F. Serologic responses in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.1065–1066, 1994.

STITES, D.P., TERR, A.I. **Basic and clinical immunology**. Connecticut: Appleton & Lange. Ed. 17, p. 869, 1991.

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

TEIXEIRA, A. C. P.; SOUZA, C. F. A.; SÁ, M. J.S.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, R. M. Brucelose: zoonose controlada? **Higiene Alimentar**, n. 54, v. 12, p. 23-25, 1998.

TELES, J. A. A.; CAMPOS, A. C.; SILVA, K. P. C.; SANTOS, A. S.; SANTANA, V.L.DE A.; CASTRO, R. S.; MOTA, R. A. Desenvolvimento e Avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.9, p.838-842, 2012.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p.4350-4354, 1979.

TRANT, C.G., LACERDA, T.L., CARVALHO, N.B., AZEVEDO, V., ROSINHA, G.M., SALCEDO, S.P., GORVEL, J.P., OLIVEIRA, S.C. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice. **Infection and Immunity**, v.78, n.5, p.2283-2291, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2003). **Animal and Plant Health Inspection Services (APHIS): Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB-51, Live Culture**. Federal Register, 18 February, 68 (32), 7761, 2003.

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

VICENTE, A.F., ANTUNES, J.M., LARA, G.H., MIONI, M.S., ALLENDORF, S.D., PERES, M.G., APPOLINÁRIO, C.M., LISTONI, F.J., RIBEIRO, M.G., MEGID, J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. **BioMed Research International**, v.2014, p.702072, 2014.

WARETH, G., MELZER, F., WEISE, C., NEUBAUER, H., ROESLER, U., MURUGAIYAN, J. Proteomics-based identification of immunodominant proteins of *Brucellae* using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen survival during the infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.456, p.202–206, 2014.

WHATMORE, A., DAVISON, N., CLOECKAERT, A., AL DAHOUK, S. ZYGMUNT, M., BREW, S., PERRETT, L., KOYLASS, M., VERGNAUD, G., QUANCE, C., SCHOLZ, H., DICK, E.J., HUBBARD, G., SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.4120-4128, 2014.

WILLIAMS, A.E., KEPPIE, J., SMITH, H. The relation of erythritol usage to virulence in the *Brucellas*. **Journal of General Microbiology**, v.37, p.285–292, 1964.

WRIGHT, A. E., SMITH, F. Application of serum test to the differential diagnosis of Typhoid and Malta fever. **Lancet**. v.1, p.656, 1897.

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

XAVIER, M.N., PAIXÃO, T.A., POESTER, F.P., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, v.140, p.149–157, 2009.

YANG, X., SKYBERG, J.A., CAO, L., CLAPP, B., THORNBURG, T., PASCUAL, D.W. Progress in *Brucella* vaccine development. **Frontiers in Biology**, v.8, p.60–77, 2013.

5 – Artigo Científico

Desenvolvimento e Padronização da Técnica de *Western Blotting* para o Diagnóstico da Brucelose Bovina no Brasil

**(Artigo formatado para o periódico Journal of Veterinary Diagnostic
Investigation)**

Desenvolvimento e Padronização da Técnica de Western Blotting para o diagnóstico sorológico da Brucelose Bovina

Resumo: A brucelose é uma doença infectocontagiosa de caráter agudo ou crônico causada por bactérias do gênero *Brucella* spp. Objetivou-se neste estudo desenvolver e padronizar uma técnica de *Western Blotting* para uso no diagnóstico da brucelose bovina. Foram analisados dois grupos de animais: o grupo I com 60 amostras de bovinos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos (30 positivas nas técnicas de AAT, 2-ME, SAT e TFC e 30 negativas na AAT) e o grupo II com 383 amostras de amostras de campo (90 positivas e 293 negativas na Fixação do Complemento). O resultado da análise no *Western Blotting* revelou banda com peso molecular de ≤ 20 kDa como sendo a banda mais reativa e com propriedade para identificar e separar os animais naturalmente infectados dos animais vacinados. A sensibilidade, especificidade e concordância do WB quando comparada com ao Antígeno Acidificado Tamponado foi respectivamente de 93%, 99% e o valor de $K= 0,938$, e quando comparada com a TFC foi respectivamente, 97%, 98% e $K= 0,929$. O WB desenvolvido e padronizado neste estudo é o primeiro teste sorológico aplicado no diagnóstico da brucelose bovina com potencial para uso como prova confirmatória da brucelose bovina.

Palavras chaves: *Brucella abortus*, Imunodiagnóstico, Proteômica.

Introdução

A brucelose é uma doença infectocontagiosa que acomete os bovinos e bubalinos, dentre outros animais, e gera graves perdas econômicas. É causada por *Brucella abortus*, um cocobacilo gram negativo, imóvel e de morfologia colonial lisa³⁰. O gênero *Brucella* possui 12 espécies descritas, sendo separadas de acordo com suas características bioquímicas, antígenos e principais hospedeiros^{10,28,32}.

O isolamento de *Brucella abortus* é considerado o método de diagnóstico mais confiável. Os materiais de eleição para o isolamento são: secreções, conteúdo purulento, conteúdo abomasal de fetos abortados, fluido cefalorraquidiano, pleural, sinovial e ascítico^{17,23}. Entretanto, a complexidade de execução e o elevado custo dificultam o seu emprego como método de rotina. Portanto o uso de técnicas sorológicas apresenta maior praticidade na rotina laboratorial. Diversas provas sorológicas são usadas no diagnóstico da brucelose bovina, porém no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) considera oficiais para o diagnóstico sorológico da doença apenas as provas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Teste de Polarização Fluorescente (FPA), Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação do Complemento (TFC)^{4,5,19}.

No Brasil, o teste do AAT é utilizado para triagem dos animais, pois apresenta alta sensibilidade, assim como o FPA que é utilizada para teste de rebanho. Os testes confirmatórios apresentam alta especificidade, e são empregados nos animais soropositivos nos testes de triagem, como o SAT, 2-ME e TFC, sendo esta última, a técnica empregada para trânsito internacional de animais^{4,20,23}.

O *Western Blotting* é uma técnica imunoproteômica amplamente utilizada para a detecção de anticorpos a partir de pequenas amostras de soro¹³. O teste detecta a interação antígeno-anticorpo e, conseqüentemente, a detecção de proteínas imuno específicas e tornou-se uma ferramenta para a tomada de decisões e interpretações devido ao resultado muito mais eficiente¹¹. Manat et al. (2016) caracterizaram a proteína externa da membrana 28 (OMP28)

como principal proteína imunodominante, possuindo emprego antigênico em potencial no sorodiagnóstico da brucelose bovina¹⁶.

Objetivou-se neste estudo desenvolver e padronizar o *Western Blotting* para fins de diagnóstico sorológico utilizando a cepa de *B. abortus* 1119-3, além de determinar a sensibilidade e especificidade frente às técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da brucelose bovina no Brasil.

Material e Métodos

Extração das proteínas de *Brucella abortus*

A extração das proteínas de célula inteira de *Brucella abortus* para a utilização como antígeno foi processada a partir da suspensão em solução salina (0,85%) da cepa *B. abortus* 1119 – 3; a cepa foi diluída em solução de tampão fosfato salino (PBS) e a concentração inicial foi estimada por meio de leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 600 nm e o valor obtido foi de $4,5 \times 10^8$ cél/mL. Para a produção do antígeno utilizado na prova, a suspensão de células foi concentrada para $9,8 \times 10^9$ cél/mL em PBS. Aproximadamente 10ml da suspensão de células foi separada para preparação inicial; este volume foi centrifugado a $4000 \times g$ por 10 min. a 4°C e o sobrenadante removido; adicionou-se 9mL de PBS para realização das lavagens seriadas, repetindo-se a centrifugação e a retirada do sobrenadante por três vezes. Ao final da 3ª etapa foram adicionados 3mL de formaldeído P.A. (Sigma Aldrich®) para a inativação e degradação da bactéria e 6mL de PBS; a mistura foi incubada em agitador tipo gangorra em temperatura ambiente *overnight*. O processamento de lavagem e degradação foi repetido por mais duas vezes. Ao final, as lavagens foram refeitas com PBS e por fim adicionou-se 3 mL de PBS. Aos 3mL de antígeno foi adicionada solução *Sample Buffer Laemili* (Sigma Aldrich®) na proporção de 1:2 e conservado a -20°C para uso posterior.

Identificação das bandas em gel

O antígeno e o marcador de peso molecular entre 250 – 10 kDa foi corrido em gel bis – tris 3% a 15%, onde 3% representa a concentração do gel de empilhamento e os 15% representa a concentração do gel de corrida, em cuba vertical de eletroforese (Invitrogen®) com solução NUPAGE MOPS SDS *running buffer* 20X (Invitrogen®) em 200 volts por 1 hora. O gel impregnado foi submetido ao processo de coloração por prata (*SilverXpress® Silver Staining Kit* - Invitrogen®) (Figura 1) e o padrão de bandas utilizado foi definido por bandas detectadas com peso molecular igual ou inferior a 20 kDa que são consideradas bandas exclusivas de *B. abortus*^{11,26}.

Produção das membranas

O antígeno impregnado no gel foi transferido para membrana de nitrocelulose com poro de 0,45µm (Invitrogen®), em cuba de eletroforese com solução NUPAGE *transfer buffer* 20x (Invitrogen®) e submetidos à potência de 30 *volts* por 1 hora. Decorrido este tempo, o marcador foi cortado e a membrana encaminhada para a solução de bloqueio (*Blocking Solution* – Candor®), onde permaneceu *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi retirada da solução de bloqueio e realizou-se três lavagens de 20 minutos com a solução de lavagem (*Washing Solution* - Candor®), na diluição de 1:20. Ao final foram realizados os cortes de aproximadamente 0,3 mm, realizando o teste da qualidade e controle da membrana. As tiras restantes foram acondicionadas em tubo tipo *Falcon* em freezer a -20°C até o momento do uso⁸.

Amostras

Foram testadas 443 amostras de soro sanguíneo de bovinos. Essas amostras foram divididas em dois grupos: G1, composto por 60 amostras, sendo 30 amostras verdadeiras positivas (VP) de bovinos que apresentavam sinais clínicos de brucelose e foram positivos nas técnicas de AAT, 2-ME, SAT e TFC e 30 amostras verdadeiras negativas (VN) de bovinos sem sinais clínicos, não vacinados e negativos na técnica de AAT. O grupo II foi composto por 383 amostras de campo, sendo 90 positivas e 293 negativas na técnica de FC.

Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

Todas as amostras de soros dos grupos I e II foram testadas na técnica do Antígeno Acidificado Tamponado, seguindo a metodologia descrita no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCETB) do MAPA⁴ em concordância com o capítulo 2.4.3 do manual de teste de diagnóstico e vacinas para animais terrestres da OIE²³.

Teste de Fixação do Complemento (TFC)

O teste de Fixação do Complemento foi realizado nos soros dos grupos I e II seguindo a metodologia descrita no PNCETB⁴ em concordância com o capítulo 2.4.3 do manual de teste de diagnóstico e vacinas para animais terrestres da OIE²². Foi utilizado o antígeno de prova lenta; para o TFC a diluição empregada foi de 1:500. O teste foi realizado seguindo a metodologia de incubação a quente, em estufa a 37°C, por uma hora⁴.

Western Blotting

Para a padronização da técnica seguiu-se a metodologia descrita por Elschner et al. (2011) com adaptações⁸.

Os soros dos dois grupos foram diluídos em solução de *LowCross* (Candor®) na proporção de 1:50 em contato com as tiras e incubados por 1 hora e 30 minutos em agitador tipo gangorra. Após o tempo inicial, realizaram-se três lavagens sucessivas de 20 minutos com a solução *Washing*; para identificação dos anticorpos no soro, foi realizada incubação com o antissoro-anti-IgG bovino na diluição de 1:100 em solução *LowCross* por 1 hora e 30 minutos em agitador tipo gangorra; ao final repetiu-se o passo das três lavagens de 20 minutos. A fase indicadora da reação constitui na adsorção sobre as tiras de membranas à solução de 4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT) (Roche®) na proporção de 1:152 com 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (Roche®) na proporção de 1:303 em solução fosfatase alcalina (0,58g de NaCl + 1,2g de trisaminometano + 101,65mg de MgCl₂.6H₂O em 10mL de água deionizada) pH 9,5 ± 0,2, por 10 min. A leitura das tiras foi realizada individualmente e comparadas com as tiras dos controles positivo e negativo.

Análise dos Dados

Para o estudo de concordância entre os testes utilizados foi empregado o coeficiente Kappa (*K*), sendo usada a interpretação convencional dos valores *K* adotados: 0,00 - 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81 - 1,00 = muito boa, valores negativos serão interpretados como equivalentes a 0,00. Para o cálculo dos valores de sensibilidade (*S*), especificidade (*E*), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACU)²⁷, os resultados foram organizados na forma de tabelas 2 x 2

(Quadro 1 e Quadro 2), onde para cada teste realizado foi feita a comparação de seus resultados com os resultados do WB.

Resultados

Os resultados obtidos para as amostras do grupo I testadas nas técnicas de AAT comparada com os resultados obtidos no WB apresentaram 100% de S, E, VVP, VPN, ACU e valor de K igual a 1. O resultado do TFC comparado ao WB também apresentou 100% de S, E, VVP, VPN, ACU e valor de K igual a 1 (Tabela 1).

Os resultados para as amostras do grupo II, analisadas nas técnicas de AAT foram 99 positivas e 284 negativas; na TFC foram 90 positivas e 293 negativas e no WB obteve-se 94 positivas e 289 negativas (Tabela 2).

O cálculo da S, E, VVP, VPN e ACU quando se comparou os resultados obtidos no AAT com WB foi: S de 93%, E de 99%, VVP de 98%, VPN de 98%, ACU de 98% e K de 0,938 e quando se comparou o WB com o TFC foi: S de 97%, E de 98%, VVP de 93%, VPN de 99%, ACU de 97% e K de 0,929 (Tabelas 3 e 4).

Discussão

Neste estudo foi desenvolvida e padronizada uma técnica de *Western Blotting* como alternativa de diagnóstico da brucelose bovina no Brasil. É importante destacar que a brucelose bovina é endêmica no território nacional e apesar dos esforços do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, esta enfermidade ainda causa grandes prejuízos à pecuária nacional e apresenta distribuição variada nas diferentes regiões do país⁴.

O diagnóstico da brucelose é um constante desafio, estando restrito aos testes sorológicos e isolamento bacteriano³; isto gera o aumento nos gastos com vacinação, sorodiagnóstico e eliminação dos animais positivos¹. A sorologia ainda não é capaz de diferenciar animais vacinados de animais naturalmente infectados, classificar as espécies de *Brucella* e evitar reações cruzadas com outros microrganismos, devido ao antígeno baseado no LPS-O presente na vacina B19 e em algumas bactérias Gram negativas^{2,12,22,25}. Deste modo, o desenvolvimento de técnicas que não necessitam da utilização de antígenos à base de LPS-O mostram-se bastante promissoras²⁶.

Em contraste com outras aplicações da técnica de *Western Blotting*^{2,6,8,11,12,13,33}, o resultado do nosso estudo buscou adaptar e padronizar a técnica desenvolvida para estudos proteômicos para assumir finalidade sorológica³¹, salientando que não existem estudos empregando a técnica de *Western Blotting* para uso sorológico no diagnóstico da brucelose bovina.

Alguns estudos descrevem as proteínas de *Brucella* sp. para utilização no WB. Pajuba et al. (2012) e Kim et al. (2014) citaram que proteínas visualizadas com peso molecular ≤ 20 kDa são consideradas exclusivas de animais naturalmente infectados por *B. abortus*, diferenciando animais vacinados com a vacina B19^{11,26}. Assim sendo, o aparecimento de reação na fita com peso molecular ≤ 20 kDa foi o definido como ponto de separação para classificação de animais positivos e negativos no WB (Figura 2).

Para a padronização e validação de uma técnica, a OIE preconiza em seu manual de princípios e métodos de validação de ensaios de diagnóstico de doenças infecciosas a execução de quatro estágios, sendo eles a caracterização analítica, caracterização diagnóstica, reprodutibilidade e implementação. Para a padronização de um teste, deve-se seguir os dois primeiros estágios do manual e para a validação, após a conclusão dos estágios anteriores, deve-se executar os dois últimos estágios. No presente estudo, realizou-se a padronização, sendo contemplados os dois primeiros passos do manual²⁴. O primeiro estágio é o teste das amostras

sabidamente conhecidas, comparando-se o teste padronizado com métodos anteriormente empregados e calculando a sensibilidade e especificidade analítica. O segundo estágio é composto pelo teste das amostras de campo para o cálculo da sensibilidade e especificidade diagnóstica. De acordo com a recomendação da OIE para padronização de teste de diagnóstico, os valores de sensibilidade e especificidade devem ser maiores a 95% para o teste ser válido²⁴.

Desta forma, o WB padronizado em nosso estudo se mostrou bastante promissor como técnica sorológica de diagnóstico quando comparada à TFC. Apresentou uma ótima especificidade (99%) e baixa sensibilidade (93%) quando comparada ao AAT. Neste caso, esta técnica não deve ser considerada uma opção para substituir o AAT para a triagem dos rebanhos por não atender os critérios exigidos pela OIE. Quando o WB foi comparado a TFC, os valores de sensibilidade (97%) e especificidade (98%) foram considerados altos e neste caso pode ser sugerido para substituir a TFC, como ferramenta diagnóstica confirmatória^{7,15,18,26,29}.

O valor de *K* para ambas comparações também foi considerado muito bom^{24,27}, corroborando com os resultados obtidos em outros estudos de padronização de *Western Blotting* para o diagnóstico da brucelose^{26,33}. O emprego de novas técnicas que utilizam proteínas imuno-específicas para o diagnóstico da brucelose agrega maior confiança na interpretação dos resultados. Para a aplicação deste teste no Brasil ainda é necessária a continuação das pesquisas para a sua validação.

Ainda existe a necessidade do desenvolvimento de testes sorológicos utilizando antígenos capazes de detectar anticorpos espécie-específicos contra *Brucella abortus* para reduzir as reações cruzadas com outros microrganismos e principalmente diferenciar a imunidade vacinal da imunidade adquirida, eliminando a problemática existente de resultados falsos positivos devido à vacinação. Além disto, é imprescindível no diagnóstico laboratorial atual implementar métodos e recursos de fácil exequibilidade e de alta segurança diagnóstica.

A técnica de imunoproteômica utilizada com finalidade sorológica apresenta aplicabilidade como ferramenta diagnóstica confirmatória da brucelose no Brasil. Além disto, é de rápida execução, menor dependência de reagentes, maior certeza diagnóstica e principalmente com a capacidade de diferenciar animais vacinados daqueles naturalmente infectados.

Agradecimento

À equipe do Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco (LANAGRO-PE) por ceder o espaço para realização do experimento e as amostras de campo e a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) por ceder as amostras dos animais verdadeiros positivos e verdadeiros negativos.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse a respeito da pesquisa, autoria e/ou publicação desse artigo.

Financiamento

O autor recebeu bolsa de estudo da Coordenação de Financiamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) para desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

1. Abalos P, Daffner J, Pinochet L, Evaluation Of Three *Brucella* Soluble Antigens Used In An Indirect Elisa To Discriminate S19 Vaccinated From Naturally Infected Cattle. *Vet Microbiol* 2000; 7:161–167.
2. Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Tomaso H, Bogumil R, Neubauer H. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections. *Journal Immunology Methods* 2006; 309:34–47.
3. ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., VERGER, J.M. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut. National de la Recherche Agronomique, Paris, France 1988.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília, 2006.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 19 de 10 de outubro de 2016. Brasília, 2016.
6. Connolly JP, Comerci D, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, Grewal P, Mujer CV, Ugalde RA, Delvecchio VG. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 2006; 6:3767–3780.
7. Dohoo IR, Wrigth PF, Ruckerbauer R, Samagh BS, Robertson FJ, Forbes LB. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1986; 50:485-493.
8. Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, Dietzsch M, Schmoock G, Santana VL De A, Souza MMA, Wernery R, Wernery U, Neubauer H. Use of Western Blot Technique for the Serodiagnosis of Glanders. *BMC Veterinary Research* 2011.
9. Eschenbrenner M, Horn TA, Wagner MA, Mujer CV, Miller-Scandle TL, Delvecchio VG. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16 m. *Journal Proteome Research* 2006;5:1731–1740.
10. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Dahouk SA, Neubauer H, Letesson JJ. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine* 2011; 102:118–131.
11. Kim JY, Sung SR, Lee K, Lee HK, Kang SI, Lee JJ, Jung SC, Park YH, Her M. Immunoproteomics of *Brucella abortus* RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2014; 160:218–224.
12. Ko KY, Kim JW, Her M, Kang SI, Jung SC, Cho DH, Kim JY. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Veterinary Microbiology* 2012; 15:374–380.

13. Lee C. Western blotting. *Methods in Molecular Biology* 2007; 362:391-399.
14. Lee JJ, Simborio HL, Reyes AW, Kim DG, Hop HT, Min W, Her M, Jung SC, Yoo HS, Kim S. Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in *Brucella abortus* 2308-challenged cattle. *Veterinary Research* 2015; 46:17.
15. MAC MILLAN, A. Conventional serologic tests. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. USA: CRC Press 1990:155-300.
16. Manat Y, Shustov AV, Evtanova E, Eskendirova SZ. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species. *Open Veterinary Journal* 2016; 6(2):71-77.
17. Mantur BG, Biradar MS, Bidri C, Mallana S, Verrappa K et al. Protean clinical manifestation & diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years experience in an endemic area. *Journal of Microbiology* 2006; 55:897-903.
18. Nielsen K, Gall D, Smith P, Vigliocco A, Perez B, Samartino LE, Nicoletti P, Dager A, Elzer P, Enright F. Validation of fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 1999; 68:245-253.
19. Nielsen K, Lin M, Gall D, Jolley M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody of *Brucella abortus*. *Methods* 2000; 22:71-76.
20. Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Robles C, Bermudez R, Renteria T, Moreno F, Ruiz A, Massengill C, Muenks Q, Jurgensen G, Tollersrud T, Samartino L, Conde S, Forbes L, Perez B, Rojas X, Minos A. Towards a single screening test for brucellosis. *Revue Scientifique et Technique Office International of Epizootics* 2005; 24:1027-1038.
21. Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R, Wernery U, Scholz HC. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* Infections in Horses. State-of-art and perspectives. *Journal of Veterinary Medicine series B* 2005; 52:201-205.
22. Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, Nicoletti P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology* 2004; 100:25-30.
23. OIE, Capítulo 2.4.3. Bovine Brucellosis. *OIE Manual de animais terrestres* 2012; 616-650.
24. OIE, Capítulo 1.1.5 Principios e metodos de validação de ensaios diagnósticos para doenças infecciosas. *OIE Manual de animais terrestres*, 2013.
25. Olsen SC, Stoffregen WS. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev. Vaccines* 2005; 4:915-928.
26. Pajuaba ACAM, Silva DAO, Karine C, Almeida KCA, Cunha-Junior JP, Pirovani CP, Camillo LR, Mineo JR. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential

- antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle. *Proteomics* 2012; 12:820–831.
27. Pereira MG. *Epidemiologia: teoria e prática*. Ed. Guarabara Koogan, S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2008.
 28. Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Koylass M, Whatmore AM, Blom J, Vergnaud G, Witte A, Aistleitner K, Hofer E. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal Systematic and Evolution Microbiology* 2016; 66:2090-2098.
 29. Stemshorn BW, Forbes LB, Eaglesome MD, Nielsen KH, Robertson FJ, Samagh BS. A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1985; 9:391-394.
 30. Teixeira ACP, Souza CFA, Sá MJS, Ribeiro RMP, Oliveira AL, Souza RM. Brucelose: zoonose controlada? *Higiene Alimentar* 1998; 54:12:23-25.
 31. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy Sciences USA* 1979; 76:4350-4354.
 32. Whatmore A, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt M, Brew S, Perrett L, Koylass M, Vergnaud G, Quance C, Scholz H, Dick EJ, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch N. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal Systematic and Evolution Microbiology* 2014.
 33. Wareth G, Melzer F, Weise C, Neubauer H, Roesler U, Murugaiyan J. Proteomics-based identification of immunodominant proteins of *Brucellae* using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen survival during the infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014; 456:202–206.

Anexos

Quadro 1: Quadro utilizado para cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia. O teste 1 é o teste ouro e o teste 2 é o teste a ser padronizado.

		Teste 1		Total
		+	-	
Teste 2	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d

Quadro 2: Fórmulas para cálculo da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (ACU).

S	E	VPP	VPN	ACU
$\frac{a}{a+c}$	$\frac{d}{b+d}$	$\frac{a}{a+b}$	$\frac{d}{c+d}$	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$

Tabela 1: Resultado dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente *K* do WB comparado ao TFC para o grupo I.

Teste	S	E	VPP	VPN	ACU	<i>K</i>
Valor	100%	100%	100%	100%	100%	1,0

Tabela 2: Número de animais positivos e negativos em cada teste sorológico empregado para o grupo II.

Técnica	AAT	TFC	WB
Positivo	99	90	94
Negativo	284	293	289
Total	383	383	383

Tabela 3: Resultado dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente *K* do WB comparado ao TFC para o grupo II.

Teste	S	E	VPP	VPN	ACU	<i>K</i>
Valor	97%	98%	93%	99%	97%	0,929

Tabela 4: Resultado dos valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente *K* do WB comparado ao AAT para o grupo II.

Teste	S	E	VPP	VPN	ACU	<i>K</i>
Valor	93%	99%	98%	98%	98%	0,938

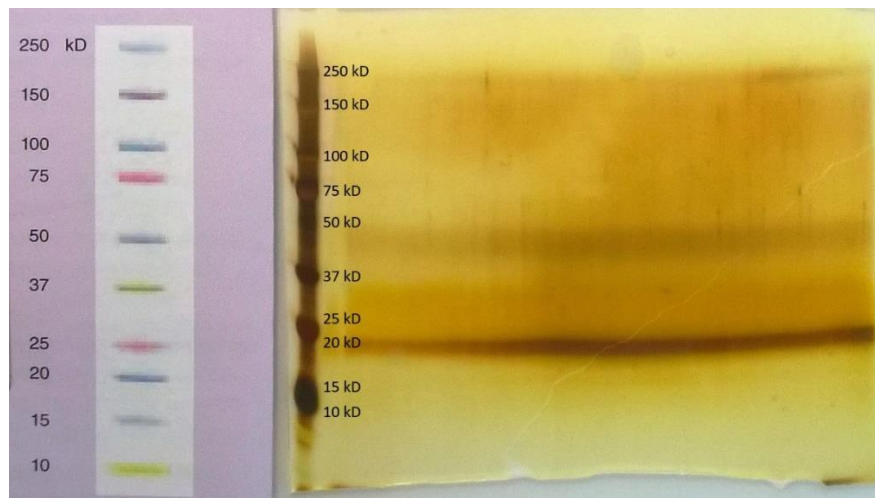


Figura 1: Gel bis - tris 3% a 15% corado por prata para visualização do antígeno impregnado e identificação do peso molecular.



Figura 2: Tiras de membranas impregnadas pelo NBT – BCIP. A e B, soropositivos; C e D, soronegativos.