

Levantamento sorológico de brucelose em bovinos monitorados no estado da Bahia*

Serological survey of brucellosis in cattle monitored in the estate of Bahia

Marcus Paulo de Matos Maturino,** Bruno Passos Fernandes,*** Lourival Souza Silva Junior,*** Diana de Oliveira Silva Azevedo,*** Bianca Pimentel Silva,*** Carlos Eduardo Crispim de Oliveira Ramos,**** Robson Bahia Cerqueira*****

Resumo

A brucelose é uma doença bacteriana de grande importância para a economia pecuária e para a saúde pública por se tratar de uma zoonose. É uma doença infecto-contagiosa que tem como agente etiológico bactérias do gênero *Brucella*. Em bovinos, as espécies do gênero é a *Brucella abortus*, que são cocobacilos gram negativo, intracelulares facultativos, imóveis e não esporulado. A infecção apresenta evolução crônica e acomete animais de todas as idades, sendo mais frequente em indivíduos sexualmente maduros. O objetivo desse trabalho é investigar, por meio da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia. Foram utilizados 666 animais, selecionados aleatoriamente no momento do abate. O sangue foi coletado com finalidade de obtenção de soro, todas as amostras foram submetidas à prova de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova do 2mercaptoetanol (2-ME) e ELISA Indireto. Das amostras reagentes no teste do AAT, obteve-se uma prevalência estimada em 1,2%. A prevalência no teste do ELISA foi de 13,21% (n=86). Esse resultado sugere a ocorrência de falsos negativos quando se utiliza a prova do antígeno acidificado tamponado.

Palavras-chaves: brucelose, abatedouro, prevalência, soro.

Abstract

Brucellosis is a bacterial disease of great importance to the livestock economy and to public health because it is a zoonosis. It is an infectious disease that has etiologic agent with bacteria of the genus *Brucella*. In cattle, the species of the genus *Brucella* is *Brucella abortus* that are gram negative, facultative intracellular, real estate and not sporulated. The infection presents chronic and affects animals of all ages, being more frequent in sexually mature individuals. This study aimed to investigate through serology for brucellosis, using the technique of indirect ELISA, samples from positive animals slaughtered in slaughterhouses inspected in the state of Bahia. A total of 666 animals were used, randomly selected at the time of slaughter. Blood was collected in order to obtain serum, all samples were subjected to a screening test Antigen Buffered Acidified (AAT), proof of 2-mercaptoethanol (2-ME) and Indirect ELISA. Of reagents in the test samples of AAT obtained an estimated prevalence of 1.2%. The prevalence in the ELISA test was 13.21% (n = 86). This result suggests the occurrence of false negatives when using the buffered acidified antigen test.

Keywords: brucellosis, slaughterhouse, prevalence, soro.

Introdução

A *Brucella abortus* é considerada uma α - Proteobacteria intracelular que causa infecções de longa duração, a cronicidade da infecção resulta da capacidade de *Brucella* sobreviver no interior de macrófagos, devido ao seu lipopolissacarídeo (LPS) com propriedades e estrutura distintas do LPS de outras enterobactérias, incluindo uma baixa endotoxicidade, alta resistência à degradação pelos macrófagos e evasão da resposta imune, o que constitui um dos principais mecanismos de virulência e replicação da *Brucella*^{5,15}. Sendo amplamente difundida em todo o mundo, principalmente na bacia do Mediterrâneo, na península arábica, no subcontinente indiano,

e partes do México, da América Central e do Sul, sendo erradicada em alguns países como Finlândia, Noruega, Suécia, Dinamarca, Países Baixos, Bélgica, Suíça, Alemanha, Áustria, Hungria, Romênia e Bulgária. Enquanto outros países conseguiram começar o processo de erradicação da enfermidade, como Inglaterra, Irlanda, Polônia, Canadá, Cuba, Panamá, Austrália e Nova Zelândia sendo o primeiro passo no processo de erradicação da doença^{17,22}. O diagnóstico da brucelose bovina pode ser realizado de forma direta com o isolamento identificação do microrganismo ou indireta com o acompanhamento da resposta imunológica do animal via sorologia. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina, instituído pelo Ministério

*Recebido em 9 de outubro de 2022 e aceito em 28 de novembro de 2022.

**Médico Veterinário Mestrando no programa de pós-graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

***Graduandos em Medicina Veterinária Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

****Professor Adjunto Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

*****Professor Adjunto Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Autor para correspondência: Robson Bahia Cerqueira – robsonba@gmail.com.

da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), preconiza a utilização de técnicas sorológicas para o diagnóstico desta enfermidade sendo as provas de triagem o teste do anel do leite, antígeno acidificado tamponado e como prova confirmatória a prova do 2-ME³. Os métodos imunológicos desenvolvidos para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentarem grande sensibilidade e especificidade, tornaram-se técnicas padronizadas para pesquisa e aplicações clínicas, nesta perspectiva a prova que é recomendada pelo PNCETB, é a prova de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbentAssay), que pode ser indireta ou competitiva, é considerada uma prova rápida, que tem um alto grau de sensibilidade e especificidade^{3,24}. Nesse método, uma enzima, que reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido, é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação, então, a presença de produto colorido indica a presença de antígeno. Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas⁸. Esse trabalho teve como objetivo investigar, por meio da sorologia para brucelose bovina, utilizando a técnica do ELISA indireto, amostras de animais reagentes abatidos em frigoríficos inspecionados no estado da Bahia.

Material e métodos

As amostras de soro foram colhidas no período compreendido entre agosto e dezembro de 2013, em dois abatedouros frigoríficos localizados nos territórios de Vitória da Conquista e Portal do Sertão, no estado da Bahia. Para o cálculo do número de animais a serem utilizados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança. O cálculo foi feito com a fórmula para amostras simples aleatórias³⁰:

$$n = \frac{Z^2 \cdot x \cdot p(1-p)}{d^2}$$

Onde: Z = coeficiente de confiança 99%, p = prevalência esperada de 50% (maximização de amostra), d = erro absoluto de 5%. Totalizando uma amostra de 666 animais. Foram utilizados animais do grupo dos bovinos, tanto machos quanto fêmeas, em idade superior a 24 meses, estando vacinados ou não, identificados pela marcação a fogo do lado esquerdo do rosto do animal para identificação da vacinação contra brucelose. Os bovinos foram escolhidos durante um dia de abate do frigorífico e as amostras foram colhidas de todos os animais que entraram na linha de abate. Os dois frigoríficos escolhidos para a coleta de amostras realizam abate de animais oriundos de outras regiões do estado.

A coleta de sangue deu-se no ato da sangria dos animais, o sangue foi coletado em tubos de ensaio de 10ml sem anticoagulante, estes tubos foram identificados e numerados, e permaneceram inclinados para facilitar o processo de retração do coágulo, visando a obtenção do soro para realização dos testes sorológicos, posteriormente as amostras foram remetidas ao LDI – Laboratório de Doenças Infecciosas do HMV – Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo

(UFRB). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm. Posteriormente, os soros foram transferidos para microtubos estéreis, que foram mantidos congelados a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Todos os animais foram submetidos ao teste de triagem do antígeno acidificado tamponado (AAT) e ao ELISA indireto. Os animais positivos nestas provas tiveram a situação sorológica confirmada com a utilização da Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Prova da Soroaglutinação Lenta (SAL).

Os testes realizados foram os preconizados pelo PNECBT do MAPA como as provas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME), Prova da Soroaglutinação Lenta (SAL) e o ELISA Indireto, utilizando-se antígeno liso, de acordo metodologia descrita por Puttini *et al.*, (2008).

Para o estabelecimento das correlações entre as variáveis que caracterizam a resposta da Brucelose nos rebanhos bovinos analisados, foi implementada uma Análise de Correspondências Múltiplas¹⁶ por serem as respostas qualitativas nominais com três ou mais classes⁴. Desta forma foram utilizadas as saídas para as variáveis transformadas. Foram testadas as prevalências referentes aos três diferentes métodos de diagnóstico (2ME/SAL; AAT e ELISA) via Modelos Lineares Generalizados (GLM) para a distribuição Gama com função de ligação log, pois não foi constatada a normalidade dos dados. O modelo utilizado é descrito a seguir.

$Y \cong \beta_0 + \beta_1 x_1 + \varepsilon$; onde:

\hat{Y} = estimativa da variável resposta (prevalência) que pode variar de 0 a 100%;

β_0 = constante geral do modelo;

β_1 = coeficiente estimado para “x”, cujo variou de 1 até n, com n = 3 níveis representando o fator “método de diagnóstico” (2ME/SAL; AAT e ELISA);

ε = representação da estimativa para o erro aleatório do modelo.

Para avaliar as diferenças entre as médias foi feita uma comparação múltipla pelo método de Bonferroni ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do Software R, versão 2.15.0 (2012).

Resultados

Os animais foram agrupados de acordo com a mesorregião, contemplado quatro mesorregiões: Mesorregião do Centro-Norte Baiano, Mesorregião do Centro-Sul Baiano, Mesorregião do Nordeste Baiano, Mesorregião Metropolitana de Salvador, e vinte e cinco municípios (Tabela 1).

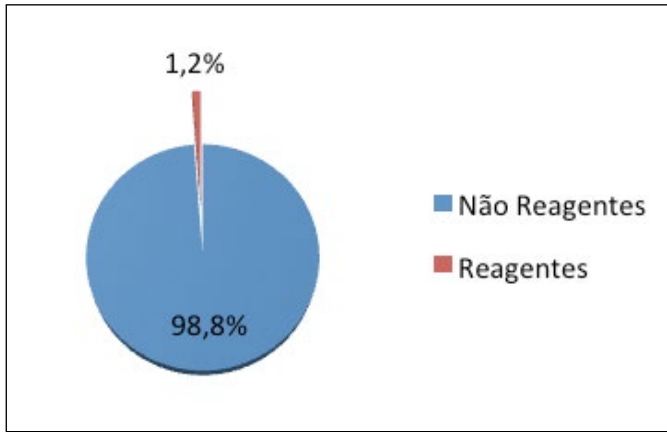
Tabela 1: Prevalência para brucelose no teste do ELISA por Mesorregião.

REGIÃO	N AMOSTRAL	PREVALÊNCIA	MÉDIA	DESVP. PADRÃO	IC 95%
NORDESTE	121	9%	0,14736	B	0,05374 0,00957
CENTRO NORTE	121	21%	0,17279	a	0,11987 0,02136
M SALVADOR	26	4%	0,16388	a	0,06074 0,02335
CENTRO SUL	398	13%	0,12609	c	0,09476 0,00931

Das amostras reagentes no teste do AAT, oito (8) foram confirmadas ao 2-ME, sendo a prevalência estimada em 1,2%

(Gráfico 1). A prevalência no teste do ELISA foi de 13,21% (n=86), sendo que essas amostras foram submetidas aos testes confirmatórios preconizados pelo MAPA, SAL e 2-ME, em que foi observada a seguinte distribuição: dos animais que foram considerados positivos no teste de ELISA, três (3) foram considerados inconclusivos, quatorze (14) foram considerados negativos e sessenta e nove (69) positivos, quando submetidos às provas confirmados SAL e 2-ME (Figura 1).

Figura 1: Prevalência da brucelose bovina em relação aos testes do AAT e 2-ME.



A prevalência da brucelose bovina por região, quando analisada pelo teste do ELISA indireto, pode ser observada na Tabela 2, com uma prevalência máxima de 21% na Mesorregião Centro Norte e uma mínima de 4% na região Metropolitana de Salvador, a média dos valores de absorbância no ELISA, obedece a uma distribuição em que a Mesorregião Centro Norte e Metropolitana de Salvador têm médias similares estatisticamente, e a Mesorregião Centro Sul e a Nordeste divergem das demais. No entanto, não se comprovou associação significativa entre as regiões e a ocorrência de brucelose no estado da Bahia (Tabela 1). Analisando a correlação das variáveis, sexo, vacinação, procedência do animal e das técnicas utilizadas, AAT, SAL, 2-ME, ELISA, em que a variável é representada pela interpretação da prova do 2-ME e SAL como preconizado pelo manual do PNCEBT, pode ser observado pela Tabela 2 que a correlação das variáveis próximas de 1 foi relevante entre as variáveis analisadas, sendo este o caso da correlação entre as variáveis sexo e vacinação, e as técnicas do SAL e 2-ME e a variável situação, sendo observada uma correlação relevante entre as técnicas da prova do 2-ME a situação sorológica do animal e a variável ELISA.

Tabela 2: Correlação entre as variáveis

	Sexo	Origem	AAT	SAL	2-ME	ELISA
Sexo	67%					
Origem	4%	12%				
AAT	14%	19%	1%			
SAL	-1%	7%	39%	25%		
2-ME	-2%	5%	39%	18%	98%	
ELISA	-9%	-2%	41%	-5%	90%	92%

Nas figuras 2 e 3, são representadas as análises de regressão das técnicas de ELISA e SAL, ELISA e 2-ME, no qual observa-se uma distribuição similar nos dois gráficos da técnica do ELISA e uma estabilidade da técnica frente ao 2-ME e SAL, quando observado o comportamento do ELISA em titulações abaixo de 50, tanto no SAL, quanto no 2-ME, esse comportamento sugere uma maior estabilidade do ELISA indireto, frente às provas confirmatórias, preconizadas pelo MAPA, e a ocorrência de falsos negativos na prova do 2-ME.

Figura 2: Análise de regressão SAL e ELISA

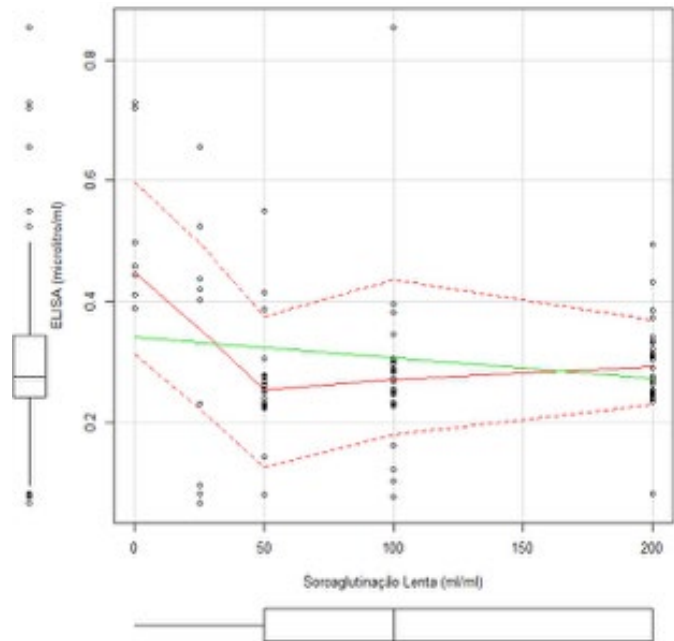
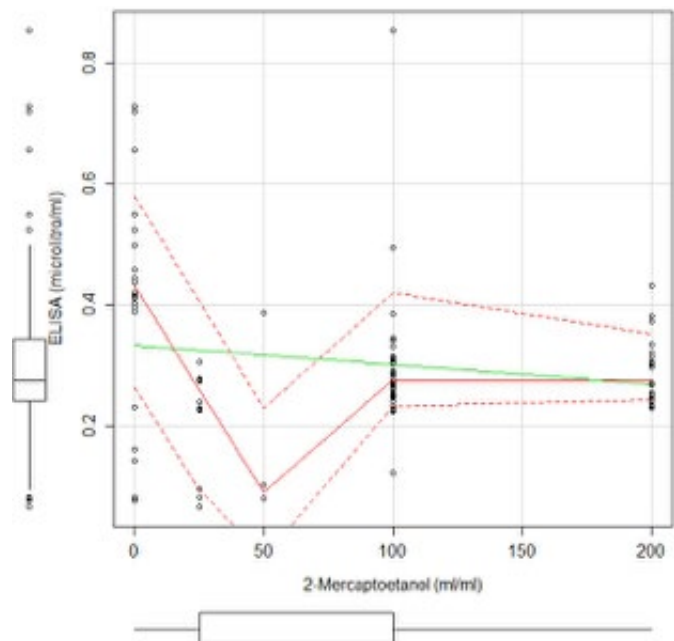


Figura 3: Análise de regressão 2-ME e ELISA



Discussão

A diferença dos resultados pode ser observada quando avaliada a prevalência da soropositividade das técnicas utilizadas, a prova do antígeno acidificado tamponado teve uma baixa sensibilidade para ser considerada uma prova de triagem, frente aos resultados obtidos, nas outras técnicas empregadas durante o trabalho, como o ELISA o e o 2-ME, divergiu de Meirelles-Bartoli e Mathias (2010)¹⁸ que em seu trabalho analisou 644 amostras com as provas do AAT e 2-ME e concluíram que o teste do antígeno acidificado tamponado apresentou elevada sensibilidade relativa, como se espera de um teste de triagem, e que os dois testes confirmatórios apresentaram elevada especificidade. Jardim *et al.* (2006)¹¹, em estudo com a utilização de dose reduzida de vacina B19, observou que as provas de fixação de complemento detectaram 46,77% de positivos, o antígeno acidificado tamponado 67,74%, o 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta 87,09%, e do ELISA indireto 100%, confirmando a superioridade do ELISA frente aos outros testes, sendo este capaz de diagnosticar de forma mais sensível os animais doentes. A análise de correlação das técnicas demonstra uma afinidade, qual seja a superioridade do ELISA na capacidade de diferenciar animais infectados reagentes no teste de animais não infectados, também observada por Putini *et al.* (2008)²⁴. A prevalência da brucelose bovina no estado da Bahia é considerada relativamente baixa, a investigação dos animais testados encontrou uma prevalência de 0,66% (ALVES, *et al.*, 2009)¹. Em um paralelo com outros estados da federação, como no Distrito Federal, 0,16% (2.019 animais examinados) (GONÇALVES *et al.*, 2009)⁹; Espírito Santo, 3,5% (5.351 animais examinados) (AZEVEDO *et al.*, 2009)²; Goiás, 1,4% (10.744 animais examinados) (ROCHA *et al.*, 2009)²⁶; Minas

Referências

- 1: ALVES, A.J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIANSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.6-13, 2009.
- 2: AZEVEDO, S.S.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU M.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; SOUZA, A.C.; VASCONCELLOS, S.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*61:19-26.
- 3: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT): Manual Técnico*, Brasília: MAPA, 2006.
- 4: BARROSO, L.P.; ARTES, R. *Análise multivariada*. Lavras: UFLA, 2003. 151p.
- 5: BARQUERO-CALVO, E.; MARTIROSYAN, A.; ORDOÑEZ-RUEDA, D.; ARCE-GORVEL, V.; ALFARO-ALARCÓN, A.; LEPIDI, H.; MALISSEN, B.; MALISSEN, M.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Neutrophils Exert a Suppressive Effect on Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella abortus*. *PLOS Pathogens*, v. 9, n. 2, p.1-13, 2014.
- 6: CHATE, S.C.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G.M.; COSTA NETO, A.A.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. 2009. Situação epidemiológica da

gerais, 1,1% (20.643 animais examinados) (GONÇALVES *et al.*, 2009b)⁹, Mato Grosso do Sul, 7,6% (9.466 animais de corte examinados) (CHATE *et al.*, 2009)⁶; Mato Grosso, 10,2% (13.684 animais examinados) (NEGREIROS *et al.*, 2009)²⁰; Paraná, 1,7% (14.857 animais examinados) (DIAS *et al.*, 2009b)⁷; Rio de Janeiro, 4,1% (8.239 animais examinados) (KLEIN-GUNNEWIEK *et al.*, 2009)¹²; Rondônia, 6,2% (9.717 animais examinados) (VILLAR *et al.*, 2009)³¹; Rio Grande do Sul, 1,0% (16.072 animais examinados) (MARVULO *et al.*, 2009)¹⁹; Santa Catarina, 0,06% (7.801 animais examinados) (SIKUSAWA *et al.*, 2009)²⁷; Sergipe, 3,4% (4.757 animais examinados) (SILVA *et al.*, 2009a)²⁸; Tocantins, 4,4% (20.908 animais examinados) (OGATA *et al.*, 2009)²¹, o que não entra em acordo com os dados obtidos no presente trabalho em nenhuma das técnicas avaliadas. SILVA JR. e colaboradores (2007)²⁸ obtiveram uma prevalência para brucelose em soro sanguíneo bovino de 8,2%, ficando acima dos resultados encontrados neste estudo utilizando a técnica do AAT.

Conclusão

O presente estudo sugere que, após análise dos soros dos bovinos destinados ao abate no estado da Bahia, foram encontrados animais reagentes para brucelose por meio dos testes de triagem AAT, a prova confirmatória do 2-Mercaptoetanol e o ELISA indireto. O ELISA indireto demonstrou ser eficaz e superior às outras técnicas empregadas, pois esta prova diagnosticou com mais precisão animais com titulações mais baixas que não foram diagnosticados pelo AAT e 2-ME. Os resultados obtidos sugerem que a prova oficial de triagem, não diagnostica de forma precisa os animais reagentes para brucelose, podendo ocorrer falsos negativos quando se utiliza a prova do antígeno acidificado tamponado.

brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:46-55.

- 7: DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:118-125.
- 8: GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. *Kuby Immunology*, 7th ed. New York: W.H. Freeman, 2012.
- 9: GONÇALVES, V.S.P.; RIBEIRO, L.A.; CALDAS, R.A.; FRANCISCO, P.F.C.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BORGES, J.R.J. 2009a. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:14-18.
- 10: GONÇALVES, V.S.P.; DELPHINO, M.K.V.C. DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; PORTO T.B.; ALVES, C.M.; FIGUEIREDO, V.C.F. e LÔBO, J.R. 2009b. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:35-45.
- 11: JARDIM, G.C.; PIRES, P.P.; MATHIAS, L.A.; RIBEIRO, O. C.; KUCHEMUCK, M.G.R. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. *Pesq. Vet. Bras.* 26(3):177-182, jul./set. 2006.
- 12: KLEIN-GUNNEWIEK, M.F.C., AMAKU, M., DIAS, R.A., FERREIRA, F., GITTI, C.B., PEREIRA, L.A., FIGUEIREDO, V.C.F., LOBO, J.R., GONÇALVES, V.S.P. e FERREIRA NETO, J.

- S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:77-84.
- 15: KO, J.; GARY, A.S. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans., *Clinical Microbiology Reviews*, V.1, n. 1, p. 65-78 Jan. 2003.
- 16: LEBART, L., MORINEAU, A.E PIRON, M. *Statistique Exploratoire Multidimensionnelle*, 3^a édition, Dunod, Paris, 2000.
- 17: LOBATO, F.; ASSIS, R.A. *Brucelose Bovina*, beef point, Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/brucelose-bovina-28520/>> Acesso em 12 de out. 2013.
- 18: MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v. 77, n. 1, p. 11-17, 2010.
- 19: MARVULO, M.F.V.; FERREIRA, F., DIAS, R.A.; AMAKU, M.; GROFF, A.C. M.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R. e FERREIRA NETO, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:93-102.
- 20: NEGREIROS, R.L.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S., GONÇALVES, V.S.P.; SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FREITAS, J. e AMAKU, M. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:56-65.
- 21: OGATA, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; RODRIGUES, A.L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. e DIAS, R.A. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:126-134.
- 22: PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada, *Medicina Interna*, Lisboa, V. 10, N. 2, p. 91-100, 2003
- 23: PSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Disponível em: <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>. Acesso em 20 de fev. 2014.
- 24: PUTINI, V.B.; CRUZ, R.B.; SANTANA G.S.; JORGE J.S.; SILVA D.L.; MOURA M.; CARMINATI R.; CERQUEIRA R. B.; PADRONIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA UTILIZANDO COMO ANTÍGENO A CEPA DE *B. abortus* INATIVADA, 2008, *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 361-370.
- 25: R Development Core Team (2012).: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.
- 26: ROCHA, W.V.; GONÇALVES, V.S.P.; COELHO, C.G.N.F.L.; BRITO, W.M.E.D.; DIAS, R.A.; DELPHINO, M.K.V.C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BRITO, L.A.B. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:27-34.
- 27: SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:103-108.
- 28: SILVA, V.G.S.O.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E.L.S.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:109-117.
- 29: SILVA JÚNIOR, F.F.; MEGID, J.; NOZAKI, C.N.; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.295-300, 2007.
- 30: THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 610p.
- 31: VILLAR, K.S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. 2009. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de Rondônia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:85-92.