UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PADRONIZAÇÃO DO TESTE "DOT BLOTTING" E COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS

Carla Resende Bastos
Medica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PADRONIZAÇÃO DO TESTE "DOT BLOTTING" E COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS

Carla Resende Bastos
Orientadora: Profª Drª Karina Paes Bürger

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

2015

Bastos, Carla Resende
B327p Padronização do teste “dot blotting” e comparação entre testes de diagnóstico de brucelose em bovinos. – – Jaboticabal, 2015
xvii, 43p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Karina Paes Bürger
Banca examinadora: Anna Monteiro Correia Lima, Luis Antonio Mathias
Bibliografia

1. *Brucella abortus*. 2. Sanidade Animal. 3. Zoonoses. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PADRONIZAÇÃO DO TESTE "DOT BLOTTING" E COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS

AUTORA: CARLA RESENDE BASTOS

ORIENTADORA: Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Karina Paes Bürger

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Departamento de Medicina Veterinaria Prevertiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS
Departamento de Medicina Veterinária Prevertiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Anna Monteiro Correa Lima

Profa. Dra. ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA
Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 30 de janeiro de 2015.

Dados Curriculares do Autor

Carla Resende Bastos, Araguari, 05/07/1988 – Filha de Manuel Teixeira Bastos Júnior e Carmen Lúcia Resende Bastos, nascida em 05 de julho de 1988, em Araguari/MG. Ingressou em agosto de 2007 no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Câmpus Umuarama, concluindo em agosto de 2012. Participou do Programa de Educação Tutorial Institucional Medicina Veterinária, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2011, desenvolvendo atividades de ensino, pesquisa e extensão. Realizou iniciação científica sobre diarreia neonatal em bezerros e diagnóstico da brucelose no Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central, localizado na Universidade Federal de Uberlândia. Realizou o estágio curricular na EMBRAPA Suínos e Aves, no setor de sanidade animal, participando da construção da coleção fiel depositária de Microrganismos de Interesse para Suinocultura e Avicultura (CMISEA). Iniciou o curso de Pós-graduação Stricto Senso, Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, em março de 2013.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles

Dedico

Aos meus pais, Manuel Teixeira Bastos Júnior e Carmen Lúcia Resende Bastos, aos meus irmãos, Fernando Resende Bastos e Jessica Mieko Ota Alves, pelo carinho, apoio e confiança incondicional. Ao meu avô Josef Laurens Lambert Muris (*in memorian*), por ser meu eterno exemplo.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, agradeço a todos que me deram a força necessária para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Agradeço aos meus pais e irmãos por serem sempre fonte de força, sabedoria, carinho e por terem me dado as condições necessárias para concluir esta etapa. À minha mãe, Carmen Lúcia Resende Bastos, que, com seu jeito amoroso e dedicado, me impulsiona ser a cada dia uma pessoa melhor; ao meu pai, Manuel Teixeira Bastos Júnior, que, com sua inteligência e seu esforço, me ajuda e encoraja; ao meu irmão, Fernando Resende Bastos, que além de irmão é meu melhor amigo e maior incentivador, sempre me animando e ajudando. À minha grande amiga, que se tornou irmã, Jéssica Mieko Ota Alves, e à minha cunhada Isabela Chiguti Yamashita Bastos, por sempre me apoiarem e se fazerem presentes nos momentos que preciso.

Aos meus cães: Tigre, Leão e Leopardo e ao meu gato Minhau, que com simples gestos me fortalecem e incentivam a querer cada dia mais me tornar uma profissional que respeita e ama o que faz, e ao meu avô Lulu, Josef Laurens Lambert Muris, já falecido, porém meu eterno exemplo de pessoa, cultura, sinceridade e inteligência, no qual me inspiro.

Ao meu namorado, Marcelo de Andrade Barbosa, que, apesar do pouco tempo juntos, é um entusiasta do meu trabalho, ouvinte atento, repleto de carinho e cuidados, um parceiro que posso contar em todos os momentos. Aos meus amigos que junto ao meu namorado, se tornaram minha segunda família, fazendo suas presenças serem essenciais para mim e meus dias mais felizes. Em especial aos meus amigos: Mirelle Andréa de Carvalho Picinato, Renata Ferreira dos Santos, Giovanna Serpa Maciel, Natasha Gandolfi Miceli, Tatiana Anjoletto, Sthefani Soares Albernaz, Marina Beanucci Delamonica Olivari, Mariana Assunção de Souza, Higor

Oliveira Silva, José Honorato Begali, Marcus Antônio Rossi Feliciano e Romeu Moreira dos Santos, por se fazerem tão especiais, sinceros e dispostos a ajudar e cuidar de mim; sem vocês, Jaboticabal perderia seu brilho; e aos meus eternos amigos que, mesmo distantes, se fazem presentes.

À minha orientadora e tutora durante a graduação, professora Anna Monteiro Correia Lima, assim como aos meus coorientadores e amigos: Tatiane Cristina Fernandes Tavares, João Helder Neves e Pollyanna Mafra Soares, e toda a equipe do Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central, localizado na Universidade Federal de Uberlândia, pois fizeram parte do início da minha vida acadêmica e do meu primeiro trabalho com diagnóstico da brucelose, o qual serviu de inspiração para o meu mestrado.

À minha orientadora de mestrado, Karina Paes Bürger, e aos professores Marcos Rogério André e Rosangela Zacarias Machado. Ao professor Luis Antonio Mathias, pela grande contribuição durante todo o decorrer do meu mestrado, sempre disposto a me ajudar. À doutoranda Marcia Jusi, ao técnico Nivaldo Aparecido de Assis e a toda a equipe (técnicos e pós-graduandos) do Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose do Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e do Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária, pois sem eles este trabalho não aconteceria.

Aos professores que participaram das bancas examinadoras (qualificação e defesa), Anna Monteiro Correia Lima, Karina Paes Bürger, Luis Antonio Mathias e Rosangela Zacarias Machado, pelas considerações e contribuições ao trabalho.

Às minhas amigas Giovanna Serpa Maciel, Natasha Gandolfi Miceli e Renata Ferreira dos Santos, pela ajuda e pelo carinho no dia da minha qualificação. Aos meus pais, Manuel Teixeira Bastos Junior e Carmen Lúcia Resende Bastos, ao meu namorado, Marcelo de Andrade Barbosa, e aos amigos presentes, pelo apoio incondicional, pela atenção e pelos cuidados no dia da defesa.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, do Departamento de Patologia Veterinária, da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação que contribuíram na minha formação.

A todos os que sempre acreditaram em mim e no meu trabalho.

“A grandeza de uma profissão é talvez, antes de tudo, unir os homens: não há senão um verdadeiro luxo e esse é o das relações humanas”.

(Antoine de Saint-Exupéry)

SUMÁRIO

Assunto	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE QUADROS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Etiologia.....	02
2.2 Importância social e econômica da brucelose.....	03
2.3 Diagnóstico.....	05
2.4 “Dot Blotting”.....	07
2.5 Prevenção e controle.....	09
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Caracterização das amostras.....	13
4. 2 Padronização do antígeno utilizado no “dot blotting”.....	14
4. 3 Padronização do “dot blotting”.....	15
4. 4 Teste “dot blotting”.....	17

4.5 Testes sorológicos..... 18

4.5.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)..... 18

4.5.2 Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)..... 19

4.5.3 Fixação de complemento (RFC)..... 20

4.6 Análise dos dados..... 22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 24

5. 1 Padronização do teste “dot blotting”..... 24

5. 2 Teste “dot blotting”..... 25

5. 3 Comparação entre os testes..... 26

5. 3. 1 Comparação entre os testes de AAT e “dot blotting” 29

5. 3. 2 Comparação entre os testes de 2-mercaptoetanol e “dot blotting”..... 30

5. 3. 3 Comparação entre os testes de fixação de complemento e “dot blotting”..... 32

5. 3. 4. Comparação entre a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados da prova do 2-mercaptoetanol e da reação de fixação de complemento, e o teste “dot blotting”..... 33

6. CONCLUSÃO..... 36

REFERÊNCIAS..... 37

PADRONIZAÇÃO DO TESTE “DOT BLOTTING” E COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE EM BOVINOS

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo padronizar e avaliar a técnica “dot blotting” para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, comparar os resultados com os encontrados nos testes de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e fixação de complemento (RFC), além de estimar a sensibilidade e a especificidade relativa do “dot blotting” em comparação com os testes de diagnóstico oficiais. Para tanto, utilizaram-se 50 amostras de soro sanguíneo bovino para padronização do teste, e foram avaliados dois antígenos: *Brucella abortus* B19 obtida a partir da vacina ANABORTINA® B19 – Merial, após processo de ruptura do microrganismo, e extrato polissacarídico obtido de amostra de *Brucella abortus* S99 pelo método água quente - fenol quente. Ao final da padronização foi estabelecida como ideal para a técnica a utilização de membrana de nitrocelulose no formato de círculo, o antígeno obtido da *Brucella abortus* após passar por um processo de ruptura do microrganismo, como suporte a placa de cultivo celular de 24 poços e fundo chato, a diluição do soro de 1:100 e do conjugado de 1:30.000, além de 3 lavagens por etapa. A avaliação e a comparação da sensibilidade e especificidade relativa aos testes de AAT, 2-ME e RFC foram feitas utilizando 1.315 amostras, sendo estes resultados comparados por meio do indicador *Kappa*. A comparação dos resultados do “dot blotting” com o AAT mostrou índice *Kappa* de 0,9081 (IC95%: 0,8542 - 0,9621), sensibilidade 88% (IC95%: 83,75% - 92,25%) e especificidade 99,45% (IC95%: 98,8% - 99,75%); com o 2-ME, índice *Kappa* de 0,9939 (IC95%: 0,939 - 1,0484), sensibilidade 99,48% (IC95%: 97,11% - 99,91%) e especificidade 99,91% (IC95%: 99,49% - 99,989%); com a RFC, índice *Kappa* de 0,8226 (IC95%: 0,7690 - 0,8761), sensibilidade 100% (IC95%: 97,42% - 100,0%) e especificidade 95,40% (IC95%: 94,03% - 96,47%). Usando a combinação dos resultados do 2-ME e da RFC para estabelecer a condição verdadeira do animal, o “dot blotting” apresentou sensibilidade relativa de 100% (IC95%: 97,25% - 100,00%), e especificidade relativa de 99,91% (IC95%: 99,48% - 99,98%). O teste avaliado mostrou-se eficaz e confiável, além de fácil manipulação e interpretação dos resultados.

Palavras-chave: *Brucella abortus*, Sanidade Animal, Zoonoses

STANDARDIZATION OF "DOT BLOTTING" TEST AND COMPARISON BETWEEN DIAGNOSTIC TESTS OF BRUCELLOSIS IN CATTLE

ABSTRACT - This study aimed to standardize and evaluate the dot blotting technique for the serologic diagnosis of bovine brucellosis, compare the results with those found in the Bengal test (AAT), 2-mercaptoethanol (2-ME) and complement fixation (CF) and also estimate the relative sensitivity and specificity of dot blotting in comparison with the official diagnostic tests. In order to do this, 50 samples of bovine blood serum were used for test standardization, and two antigens were evaluated: *Brucella abortus* B19 bacteria obtained from ANABORTINA® B19 vaccine - Merial, after the rupture process of the microorganism, and a polysaccharide extract obtained from a sample of *Brucella abortus* S99 by the hot water method - hot phenol. At the end of standardization, the use of nitrocellulose membrane in a circle format was established as ideal for the technique, the antigen obtained from *B. abortus* bacteria after going through the rupture process of the microorganism, as a support a cell culture plate with 24 flat bottom wells was used, a dilution serum of 1:100 and the conjugate of 1:30,000, and washing 3 times per step. The evaluation and comparison of relative sensitivity and specificity with the AAT, 2-ME and CF tests was done using 1,315 samples, and these results were compared using the *Kappa* indicator. The comparison between the results of dot blotting and the AAT showed a *Kappa* index of 0.9081 (IC95%: 0.8542 – 0.9621), sensitivity of 88% (IC95%: 83.75% - 92.25%) and specificity of 99.45% (IC95%: 98.8% - 99.75%); 2-ME test, *Kappa* index of 0.9939 (IC95%: 0.939 – 1.0484), sensitivity of 99.48% (IC95%: 97.11% - 99.91%) and specificity of 99.91% (IC95%: 99.49% - 99.989%); complement fixation test, *Kappa* index of 0.8226 (IC95%: 0.7690 – 0.8761), sensitivity of 100% (IC95%: 97.42% - 100%) and specificity of 95.40% (IC95%: 94.03% - 96.47%). Using the combination of the results of 2-ME and RFC to establish the true condition of the animal, the "dot blotting" showed a relative sensitivity of 100% (IC95%: 97.25% - 100%), and a specificity of 99.91% (IC95%: 99.48% - 99.98%). The assessed test proved itself to be effective and reliable, as well as being easy to handle and interpret the results.

Keyword: *Brucella abortus*, Animal Health, Zoonoses

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
01	Classificação para cálculo de sensibilidade e especificidade	22
02	Associações de resultados obtidos nos testes de antígeno acidificado tamponado, 2-Mercaptoetanol, fixação de complemento e “dot blotting” das 1315 amostras do presente estudo, realizado na UNESP Câmpus Jaboticabal, nos anos de 2013 e 2014.....	28
03	Comparação entre os testes de antígeno acidificado tamponado (AAT) e “dot blotting”, para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando o AAT como referência na comparação.....	30
04	Comparação entre os testes de 2-mercaptoetanol (2-ME) e “dot blotting” para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando o 2-ME como padrão-ouro na comparação.....	31
05	Comparação entre os testes de fixação de complemento (RFC) e “dot blotting” para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando a RFC como padrão-ouro na comparação.....	32
06	Resultados do teste “dot blotting” em comparação com a condição do animal, determinada pela combinação dos resultados da prova do 2-mercaptoetanol e da reação de fixação de complemento, para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.....	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
01	Resultados observados na técnica “dot blotting” para diagnóstico de brucelose em bovinos. As amostras I, II e III demostraram resultados positivos com diferentes tonalidades de coloração; já a amostra IV, por não apresentar reação, foi considerada negativa.....	17
02	Resultados observados na técnica “dot blotting” para diagnóstico de brucelose em bovinos. As membranas da fileira 1 demostraram resultados positivos com diferentes tonalidades de coloração, e na fileira 2 membranas com resultados negativos, sem reação de cor...	25
03	Resultado de uma placa do teste de “dot blotting” para diagnóstico de brucelose em bovinos, contendo dois controles negativos e dois controles positivos.....	26
04	Gráfico de número de amostras por resultado dos testes de AAT, RFC, 2-ME e “dot blotting” de 1.315 amostras de soros sanguíneos de bovinos para diagnóstico de brucelose.....	27

LISTA DE QUADROS

QUADRO		Página
01	Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas com *Brucella abortus* B19 entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2004).....	20
02	Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas não vacinadas com *Brucella abortus* B19 e machos com idade superior a oito meses (BRASIL, 2004).....	20
03	Interpretação da concordância pelo coeficiente *Kappa*, segundo PEREIRA (2000).....	23

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa de caráter crônico que acomete os animais, gerando grandes prejuízos à pecuária. Também é um problema de saúde pública, por ser uma zoonose de caráter ocupacional, transmitida por contato com anexos fetais contaminados com o agente etiológico *Brucella abortus*, e de origem alimentar, pela ingestão de leite não pasteurizado ou não fervido, queijo frescal e carne mal passada provenientes de animais com brucelose.

Devido a importância social e econômica dessa doença o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) aprovou o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), que definiu como testes oficiais para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina: anel em leite (TAL), utilizado para monitoramento da condição sanitária e como ferramenta de diagnóstico em sistemas de vigilância epidemiológica, antígeno acidificado tamponado (AAT) como teste de triagem e 2- mercaptoetanol (2-ME) e fixação de complemento (RFC) como testes confirmatórios, além do teste de fluorescência polarizada (TFP).

No entanto, existem algumas dificuldades com relação aos testes, fato que ressalta a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico com o intuito de colaborar para o controle e erradicação da brucelose. O “dot blotting” tem como característica fundamental a identificação de anticorpos contra proteínas específicas, marcadoras de uma doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia

A brucelose é uma antropozoonose de evolução preferencialmente crônica e caráter granulomatoso difuso (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003), causada por uma bactéria intracelular facultativa (*Brucella abortus*), Gram-negativa, cocobacilos pequenos (0,5 a 0,7 por 0,6 a 1,5 µm), colônias pequenas, lisas, com tom esbranquiçado não hemolíticas, imóveis, não capsulados, não formadoras de esporos, sendo parasitas intracelulares facultativos, com predileção pelo trato reprodutivo, articulações e sistema retículo-endotelial, pertencente ao gênero *Brucella spp*., sendo a distinção entre as espécies realizada por provas bioquímicas e sorológicas. As espécies do microrganismo são associadas a diferentes hospedeiros, *Brucella abortus* a bovinos e bubalinos, *Brucella suis* a suínos*, Brucella melitensis* a ovinos e caprinos, *Brucella ovis* a ovinos, *Brucella canis* a caninos, *Brucella neotomae* ao rato-do-deserto, *Brucella microti* a camundongos do campo, *Brucella pinnipedialis* a pinipídeos e *Brucella ceti* a cetáceos (FOSTER et al., 2007; SCHOLZ; KÄMPFER; CLOECKAERT, 2012).

O gênero *Brucella* pode ser dividido em dois grupos antigenicamente distintos: as lisas (*B. abortus, B. melitensis e B. suis*) e as rugosas (*B. ovis e B. canis*). A *B. abortus* subdivide-se em sete biovares (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) e a estirpe vacinal B19, sendo a biovariedade 1 muito frequente no Brasil (POESTER et al., 2009; MINHARRO, 2009) e na maioria das regiões no mundo (CORBEL; ELBERG; COSIVI, 2006), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3), e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, embora apresentem variantes, não se subdividem em biovares (PAULIN, 2003).

A espécie mais patogênica e invasora no homem é a *B. melitensis*, seguida de *B. suis, B. abortus e B. canis* (ACHA; SZYFRES, 2001), sendo a *B. abortus* o alvo do PNCEBT, que estabelece o controle e a erradicação da brucelose que acomete bubalinos e bovinos (BRASIL, 2006).

2.2. Importância social e econômica da brucelose

A brucelose é uma zoonose com mecanismos de evasão que lhe permitem persistência intracelular (WYATT, 2013). Seleem, Boyle e Sriranganathan (2008) referiram que as *Brucella* não possuem os genes clássicos de virulência, e sim fatores de virulência que evitam a resposta imune e aumentam sua sobrevivência. Esses são os determinantes moleculares que permitem à bactéria invadir, resistir à morte e se replicar em células fagocitárias, pois as *Brucella* lisas inibem a apoptose da célula hospedeira (ANTUNES; MEGID, 2013).

A *Brucella abortus* produz taxas de mortalidade baixas, no entanto provoca quedas na produtividade e no desenvolvimento do animal (WYATT, 2013). Destaca-se como causadora de perdas econômicas diretas, relacionadas com a diminuição do desempenho reprodutivo nos animais de produção. Estimativas apontam a brucelose como responsável pela diminuição na produção de leite, carne e de bezerros (LAGE et al., 2008), além de gerar prejuízos econômicos ao tornar o produto vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (FERREIRA NETO, 2003).

As principais manifestações nos animais, como aborto, nascimento de bezerro prematuro, esterilidade e baixa produção de leite, contribuem para considerável decréscimo na produção de alimentos, com efeitos desastrosos para a pecuária e para a sociedade (POESTER et al., 2009; CORRÊA, 2012).

A brucelose é endêmica em muitas áreas e presente na maioria dos países. Mesmo em regiões que estão livres da doença há a ameaça da reintrodução (MCGIVEN, 2013). Dados oficiais brasileiros permitem afirmar que a brucelose bovina está presente em todo o território nacional, embora existam grandes diferenças entre regiões e, por consequência, entre os estados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2002; POESTER et al., 2009). O Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou o PNCEBT, que realizou estudos de caracterização epidemiológica, entre os anos 2001 e 2004, na maioria das unidades da Federação, e os resultados, publicados

em 2009, mostraram que a enfermidade está distribuída, ainda, por todo o país, embora com taxas de prevalência variáveis (POESTER et al., 2009).

Além dos fatores econômicos associados à brucelose, destaca-se a importância na saúde pública, por ser uma zoonose, conhecida desde épocas remotas. Há registros de que Hipócrates, em 460 A.C., fazia referência a pacientes com sintomas compatíveis com essa doença, e hoje ela se encontra com distribuição cosmopolita, implicando risco à saúde humana (POESTER et al., 2009).

É uma zoonose ocupacional, que tem como fatores de risco a ingestão de alimentos contaminados e o exercício de atividades que envolvam contato com animais (FREITAS, et al., 2001). No ser humano, a manifestação clínica é responsável por queda de rendimento no trabalho, por causar prejuízos à saúde humana, como fortes dores e febre intermitente (POESTER et al., 2009; CORRÊA, 2012).

O abate de animais é uma das atividades de risco de contrair essa infecção, pois envolve contato direto com fontes de infecção, como contato com carcaças e vísceras de animais infectados abatidos, e posteriormente existe o risco do consumo dessa carcaça pela população. O agente etiológico também pode ser transmitido por meio de aerossóis formados nos ambientes do estabelecimento de abate (FREITAS et al., 2001).

Apesar de demonstrações e divulgações a respeito do risco decorrente do consumo e da manipulação de alimentos crus ou não adequadamente tratados pelo calor, e do contato com animais sem medidas de precaução, os cuidados continuam a ser negligenciados, e a brucelose se estabelece como um problema de saúde pública no mundo (FREITAS et al., 2001), frequentemente subdiagnosticada em muitos países endêmicos (WYATT, 2013).

O estudo da brucelose serviu como base para alguns dos grandes avanços na epidemiologia, e continua a ser uma das infecções bacterianas crónicas mais comuns no mundo, sendo um importante problema médico, veterinário, socioeconômico e conservacionista, principalmente por ter prevalência subestimada (GODFROID et al., 2013).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico é essencial para um programa de controle e erradicação. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico, baseado nos sinais; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, nos exames complementares diretos e indiretos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

O diagnóstico clínico é complicado, pela escassez de sinais confiáveis. Isso o torna não confiável e dependente de informações epidemiológicas, que frequentemente estão ausentes (MCGIVEN, 2013). Para o diagnóstico da maioria das doenças infecciosas, o fator mais importante é o isolamento por meio do cultivo, com posterior identificação do patógeno. Assim, é possível dizer que uma enfermidade infecciosa é diagnosticada com segurança depois do isolamento e identificação do agente. Porém, no caso da brucelose, este processo é lento e oneroso, principalmente pela necessidade de investigar muitos animais nos programas de vigilância, e de elevado risco por se tratar de importante zoonose (MOLNÁR et al., 1997). A probabilidade de obter uma cultura positiva de material de um animal infectado é demasiadamente baixa para o diagnóstico de confiança. Além disso, a cultura não é uma técnica adequada para a rotina dos laboratórios, devido a custos, dificuldades e perigos que ela apresenta, sendo necessário realizar a técnica em laboratório com nível de biossegurança três (MCGIVEN, 2013).

Devido a essas limitações, para uso em grandes rebanhos os métodos sorológicos são os mais adequados (MEGID et al., 2000). Para o controle eficiente e a erradicação da brucelose é necessário que o diagnóstico seja seguro e de execução viável; assim, somente as provas sorológicas são indicadas (DIAS et al., 2002).

A sorologia permite o monitoramento tanto de rebanhos como de regiões inteiras, mesmo onde a doença já foi erradicada (ALTON et al., 1988). Testes sorológicos baratos e eficazes para brucelose são os que buscam detectar anticorpos no soro sanguíneo e no leite (FERREIRA NETO, 2003). A sorologia é o esteio do diagnóstico da

brucelose, pois o material de diagnóstico é relativamente acessível e os testes são relativamente baratos, sensíveis e específicos (MCGIVEN, 2013).

A sensibilidade e a especificidade são dois importantes critérios para a escolha de testes de diagnóstico a serem usados em programas sanitários. A sensibilidade é a habilidade de um teste de identificar um animal infectado, e a especificidade é a habilidade para designar seguramente os animais não infectados pelo agente em questão (HUBER; NICOLETTI, 1986).

De acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2004), o teste de triagem para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina é o antígeno acidificado tamponado (AAT), e como testes confirmatórios podem ser usados: o teste de fixação de complemento (RFC) e o 2-mercaptoetanol (2-ME) em associação com o teste de soroaglutinação em tubo (SAL). O programa prevê também o uso do teste do anel em leite (TAL) como ferramenta de vigilância epidemiológica, e o teste de polarização fluorescente (TPF) foi aprovado para uso no programa, como teste confirmatório ou como teste único (BRASIL, 2010).

Para a triagem individual dos animais do rebanho é necessário realizar o AAT, que é sensível e de fácil execução, realizado por médicos veterinários habilitados, por laboratórios credenciados ou por laboratórios oficiais credenciados (BRASIL, 2004). Apesar das vantagens apresentadas, esse teste enfrenta problemas, como a dificuldade de leitura quando o técnico não está devidamente treinado ou até mesmo quando os positivos têm uma fraca reação, ou a amostra não está devidamente conservada, além de poder apresentar reações falso-positivas (MEGID et al., 2000).

Os animais que reagirem no teste de triagem poderão ser submetidos a um teste confirmatório, o 2-mercaptoetanol, que é mais específico, e executado por laboratórios credenciados ou por laboratórios oficiais credenciados (BRASIL, 2004). Este teste está sujeito à ocorrência de resultado falso-negativo (NIELSEN, 1995). Dessa forma, pode não ser uma prova adequada para a identificação de animais infectados recentemente (BERCOVICH, 1998), além de ser uma técnica onerosa, utilizando grande quantidade de reagentes, ocupando grandes espaços quando são testadas muitas amostras, uso

de substância tóxica, e necessidade de amostras de soro em condições ótimas de conservação (KURODA et al., 2004; MATHIAS et al., 2010).

Quando se obtém um diagnóstico inconclusivo no teste do 2-mercaptoetanol, pode-se utilizar outro teste confirmatório para chegar a um diagnóstico final, como o teste de fixação de complemento (BRASIL, 2004). No entanto, esse teste mostra dificuldades quanto à realização, pois necessita de pessoal altamente treinado, usa reagentes lábeis que precisam ser constantemente preparados e titulados, está sujeito à ocorrência de atividade anticomplementar, principalmente em amostras mal conservadas, e à ocorrência de efeito prozona, que pode levar à obtenção de resultados falso-negativos (MATHIAS et al., 2010), e sensibilidade insuficiente (DIAS et al., 2002). Além do fato de não haver uma padronização internacional (ALTON et al., 1988; ACHA; SZYFRES, 2001).

O método de diagnóstico mais recentemente incorporado ao PNCEBT foi o teste de polarização fluorescente (TPF), porém a técnica necessita de equipamentos específicos e os reagentes possuem custo elevado, restringindo sua utilização a grandes centros de pesquisa (DAJER et al., 1999; FARIA, 2010).

O sucesso de um programa de controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. Os critérios adotados para a escolha de tais testes são: custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença (CHAPPEL, 1989).

2.4. “Dot Blotting”

Durante a última década, os ensaios imunoenzimáticos foram empregados devido à sua elevada viabilidade, sendo muito úteis para fins de diagnóstico e utilizados em levantamentos epidemiológicos. No entanto, grande parte destes testes precisam de um leitor próprio, que nem sempre está disponível em trabalhos de campo ou pequenos laboratórios (VAZ et al., 1990).

Imunoensaios enzimáticos são poderosos sistemas de detecção ou quantificação de anticorpos, antígenos e haptenos em fluidos biológicos, por medição de atividades enzimáticas, como um amplificador de reação. O “dot blotting” é um teste muito sensível, específico e reprodutível, com vantagens sobre o ELISA clássico (VAZ et al., 1990). Devido ao menor custo das membranas de nitrocelulose em comparação com a placa de poliacrilamida de 96 poços, o custo da técnica é menor que o habitual do ELISA. As facilidades de execução assim como a utilização de reagentes menos tóxicos permitem recomendar sua utilização (ROJAS et al., 1986).

Considerando que este teste não requer laboratório com alto nível tecnológico, pode ser ideal para utilização em países em desenvolvimento. Dada a sua simplicidade, não exigindo instrumento complexo de laboratório, é particularmente adequado para o diagnóstico em grande escala em regiões com restrição de tecnologia (MISTRELLO et al., 1995).

O “dot blotting” também é conhecido com dot-ELISA, Dot immunobinding assay, Dot-blot ELISA, entre outras denominações. Devido à grande quantidade de terminologias para essa metodologia, Towbin e Gordon (1984) adotaram o termo mais fidedigno ao processo real – “dot blotting”, pois a técnica implica a aplicação direta do antígeno sob a forma de um ponto na membrana de nitrocelulose, fase sólida do imunoensaio, e ao final do procedimento e das etapas os positivos coram.

A característica fundamental desta técnica é a identificação de anticorpos contra proteínas específicas, marcadoras de uma doença (BATRA et al., 1988; CAMARGO et al., 1992). Esse antígeno é imobilizado em uma membrana de ligação constituída de nitrocelulose, onde é apresentado ao anticorpo primário e ao anticorpo secundário. Uma vez que exista vínculo entre o antígeno e o anticorpo, a reação é visualizada por alteração de cor na membrana (HERBELING; KALTER, 1986). A característica distintiva desta metodologia é a capacidade de manter a reatividade do antígeno sobre uma fase sólida durante o percurso dos procedimentos (TOWBIN; GORDON, 1984). A estabilidade que a membrana confere ao antígeno, após a aderência, proporciona sua conservação por um período prolongado à temperatura ambiente, viabilizando o uso do teste no campo (HERBELING; KALTER, 1986). Towbin, Staehelin e Gordon (1979)

afirmaram que o uso de nitrocelulose em técnicas de diagnóstico apresenta melhor capacidade de detectar substrato.

Devido a suas características, o “dot blotting” é uma técnica sorológica com alta sensibilidade e de fácil realização, o que indica sua aplicação como teste de rotina (GHORBANPOOR et al., 2006; PINHEIRO; OLORTEGUI; GOUVEIA, 2006; BASTOS, 2011). Vem sendo utilizado no estudo e no diagnóstico de doenças, tanto em humanos quanto em animais domésticos, em diferentes áreas, como parasitologia, bacteriologia e virologia (ARAGÃO, 2007), além da utilização para detecção de vírus em plantas (ALMEIDA; OLIVE; RESENDE, 2000). Georgieva (2002) fez uso do “dot blotting” para o diagnóstico do reovírus aviário, e o teste demonstrou-se econômico e de fácil execução, tendo ainda alta sensibilidade. A praticidade de realização e interpretação viabilizam a utilização da técnica (PINHEIRO; OLORTEGUI; GOUVEIA, 2006).

O teste pode ser usado como método quantitativo, quando se deseja verificar a concentração do antígeno, ou, ainda, como qualitativo, separando amostras em positivas ou negativas (PINHEIRO, 2001). São notórias as vantagens identificadas na técnica de ”dot blotting”, além de não requisitar aparelhagem sofisticada (REQUEJO et al., 1994; PINHEIRO, 2001; PINHEIRO; OLORTEGUI; GOUVEIA, 2006) e ainda pelo fato de ser um teste flexível, podendo ser realizado com o número de membranas equivalente ao de amostras, evitando desperdícios. Além disso, o suporte é feito de plástico hidrofóbico, impedindo que as substâncias (antígeno, anticorpo, tampões) possam extravasar de um poço para outro, provocando reações cruzadas (LIN; HALBERT, 1986). A facilidade e a simplicidade de utilização da técnica a tornam uma excelente ferramenta de diagnóstico.

2.5. Prevenção e controle

O controle da brucelose parte basicamente de ações de vacinação em massa de fêmeas, diagnóstico e sacrifício dos animais positivos. Assim, todas as fêmeas bovinas e bubalinas devem ser vacinadas entre três e oito meses de idade com a amostra B 19,

somente uma vez na vida. É proibida a vacinação de machos de qualquer idade e de fêmeas com idade superior a oito meses, evitando que a fêmea apresente títulos aglutinantes persistentes em testes sorológicos, após os 24 meses de idade (BRASIL, 2004).

O Brasil conta com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, cujas propostas incluem: vacinação contra a brucelose, certificação de propriedades livres e propriedades monitoradas para brucelose e tuberculose, controle de trânsito de reprodutores e normas sanitárias para a participação em eventos e aglomerações de animais, habilitação e capacitação de médicos veterinários, participação do serviço oficial, diagnóstico e apoio laboratorial; propostas organizadas de maneira que as ações sanitárias sejam executadas em conjunto com a sociedade e que essa se sinta responsável pelo sucesso do programa (MONTEIRO, 2004).

De acordo com Monteiro (2004), mesmo com as propostas estabelecidas, existem dificuldades em recomendar estratégias para controle ou erradicação da brucelose que possam ser aplicáveis ou praticáveis em todas as circunstâncias e locais, devido às adversidades encontradas e às significativas diferenças entre propriedades e regiões brasileiras.

Devido a essas adversidades e diferenças entre regiões, somente os testes sorológicos são métodos de diagnóstico convenientes, constituindo uma das principais bases em que se apoiam os programas de controle e erradicação (DIAS et al., 2002). A importância do diagnóstico e a necessidade de testes precisos geraram incentivo para o desenvolvimento de uma variedade de testes de diagnóstico da brucelose (FARIA, 2010; CHAPPEL, 1989). A detecção de anticorpos é o recurso mais utilizado quando se trabalha com rebanhos, pois os métodos são rápidos, de fácil execução e baixo custo, além de apresentarem boa sensibilidade e especificidade (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A produtividade dos rebanhos está diretamente relacionada com a sanidade. O combate à brucelose é de extrema importância para evitar maiores prejuízos ao rebanho e para o ser humano, e deve ser realizado de forma eficaz, pelo conhecimento do agente causador, seu local de atuação e a frequência de ocorrência, o que leva a

uma dependência de métodos de identificação dos animais ou rebanhos infectados (RIBEIRO, 2003).

Devido a esses fatores, é de suma importância a elaboração de técnicas mais práticas, menos tóxicas, não onerosas e que apresentem bons resultados. A disponibilidade de métodos confiáveis para o diagnóstico é essencial em programas de combate à brucelose, devido à importância econômica e social desta zoonose (DIAS et al., 2002).

3. OBJETIVOS

Padronizar e avaliar a técnica “dot blotting” para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina e comparar os resultados com os encontrados nos testes oficiais: antígeno acidificado tamponado, fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, além de estimar a sensibilidade relativa e a especificidade relativa do “dot blotting” em comparação com os testes de diagnóstico oficiais utilizados no trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

4.1. Caracterização das amostras

Para realização da pesquisa foram utilizadas 50 amostras de soro sanguíneo bovinos para padronização do teste, e 1.315 amostras para avaliação e comparação entre os testes de: antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol, fixação de complemento e “dot blotting”.

Foram testados amostras de soro de bovinos de diversas raças, machos e fêmeas, de diferentes propriedades e regiões dos estados de Goiás, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Sergipe e Tocantins encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. As amostras utilizadas no trabalho foram enviadas para diagnóstico de leptospirose e/ou brucelose de rotina do laboratório, e reaproveitadas no presente trabalho, seguindo os princípios dos três R’s, descrito por Russell e Burch, (1959). Substituindo o uso de animais sencientes exclusivamente para o trabalho, aproveitando as amostras de soro retiradas nas propriedades para avaliação de rotina da sanidade dos animais, sem elevar o nível de estresse e trauma do mesmo, nem prejudicar a confiabilidade dos resultados. Os dados como número do animal, propriedade, região, médico veterinário responsável e observações que acompanhavam as amostras foram arquivados.

4. 2. Padronização do antígeno utilizado no “dot blotting”

A padronização foi iniciada com a escolha dos antígenos a serem testados na técnica, tendo como critério as características do microrganismo de interesse.

Os antígenos avaliados foram: a bactéria *Brucella abortus* obtida a partir da vacina ANABORTINA® B19 - Merial, após passar por um processo de ruptura do microrganismo, seguindo a metodologia desenvolvida pelo laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária UNESP, Câmpus Jaboticabal. O método se dá pelo congelamento por 5 minutos em nitrogênio líquido e descongelamento por 5 minutos em banho-maria a 37°C, vinte vezes consecutivas, até a verificação em microscópio óptico que a bactéria não estava mais íntegra. O antígeno foi centrifugado duas vezes a 2.000 G (Raio do rotor de 10,5 cm, correspondente a 4.128 RPM) por 15 minutos, e ao final do processo o sobrenadante foi diluído em 10 mL de água mili-Q. O segundo antígeno a ser testado foi o extrato polissacarídico (LPS) obtido de amostra de *Brucella abortus* S99 de acordo com a técnica descrita por Baker e Wilson (1965).

Os antígenos foram quantificados pelo BCA Reagent KIT, Pierce Chemical Reagentes Company, conforme descrito nas instruções do produto. O kit é capaz de fornecer determinação precisa da concentração de proteína e de LPS em lisados de células inteiras ou de áreas específicas do microrganismo. O antígeno obtido após a ruptura do microrganismo foi dosado em 3,1 µg/µL e o extrato polissacarídico obtido de amostra de *Brucella abortus* S99 em 0,52 µg/µL. Com o intuito de padronizar e estabelecer a quantidade ideal de antígeno utilizado, foram realizados testes com 0,5 µg, 1µg, 1,5 µg e 2 µg dos antígenos testados. A quantidade que demonstrou melhor resultado para os dois antígenos testados foi de 2 µg, concentração que possibilitou a visualização da reação de cor com excelente nitidez, ao passo que com quantidades inferiores não foi possível visualizar a reação de cor ao final do processo com nitidez suficiente para distinguir as membranas com resultados positivos das com resultados negativos; a mesma quantidade foi descrita como ideal para sensibilização da

membrana de nitrocelulose para diagnóstico e sorotipagem do *Streptococcus* por Fenoll (1997). Desta forma, foi estabelecido o valor de 2 µg para sensibilização das membranas do “dot blotting”.

4. 3. Padronização do “dot blotting”

Para a padronização foram utilizadas 50 amostras de soro sanguíneo bovino, sendo 17 positivas com diferentes titulações (fraco, médio e forte) e 33 negativas nos testes oficiais: antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol e fixação de complemento. Para a padronização só foram usadas amostras que obtiveram o mesmo resultado em todos os testes oficiais.

A técnica foi desenvolvida a partir da metodologia descrita por Fenoll et al. (1997) e padronizada respeitando as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) de utilização dos mesmos equipamentos durante toda a padronização do teste (BAHIA, 2001).

O teste foi iniciado com o corte da membrana de nitrocelulose para sensibilização com os antígenos a serem testados. Foram testados dois formatos da membrana, quadrado e círculo, com o interesse de estabelecer o formato que possibilita-se a melhor homogeneização das soluções e economia de material na confecção dos cortes.

Cada membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 2 µg de antígeno, manipulada com pinça e luvas, para evitar a contaminação por proteínas estranhas, e colocada em uma superfície de material hidrofóbico. Como suporte para realização das reações foram avaliados dois tipos de placa, a de poliacrilamida Nunclon ™ Surface de 96 poços e a de cultivo celular de 24 poços e fundo chato, placas utilizadas em laboratórios convencionais e de fácil acesso.

As membranas sensibilizadas foram bloqueadas por 12 horas com 300 µL de TBS Tween 20 com adição de 5% de leite em pó, para minimizar a ocorrência de reações inespecíficas (ALMEIDA; OLIVE; RESENDE, 2000), porque detergentes

suaves, como o Tween 20, são bons agentes bloqueadores (BATTEIGER; NEWHALL; JONES, 1982); a placa ficou sob agitação a 4°C.

Após a incubação, foi retirada a solução de bloqueio e pipetados em cada poço da placa 500 µL do soro a ser testado, diluído nas proporções 1:25, 1:50 e 1:100 em TBS Tween 20 com leite em pó a 5%. O material foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante.

Finalizando a incubação, os poços foram lavados com TBS Tween 20. Avaliou-se qual o melhor número de lavagens: 1, 2 ou 3 vezes, sendo cada lavagem de 5 minutos. Em seguida foram colocados 300 µL do conjugado, IgG de coelho anti-IgG total de bovino ligada a fosfatase alcalina (Sigma, Aldrich. St. Louis, USA), nas diluições 1:4.000; 1:10.000; e 1:30.000. O material foi incubado por uma hora em temperatura ambiente, e a revelação foi feita com o substrato de coloração: Kit AP Conjugate Substrate – Bio-Rad, seguindo as recomendações do fabricante.

A revelação teve duração de 5 minutos, por ser o momento no qual as membranas positivas coram nitidamente e as negativas mantêm-se com a coloração original, seguida de 5 minutos de lavagem em água destilada, para retirar toda reação de cor não específica proveniente de resíduo do substrato.

Na leitura dos resultados, a interpretação foi por observação visual das membranas. As amostras positivas foram padronizadas como contendo um círculo de coloração arroxeada forte ou fraca, rodeado por um círculo sem coloração, e as negativas, sem coloração, como ilustrado na Figura 1.

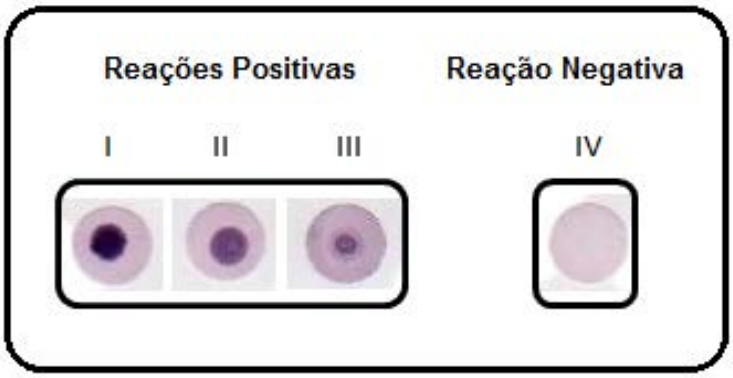


FIGURA 1 - Resultados observados na técnica "dot blotting" para diagnóstico de brucelose em bovinos. As amostras I, II e III demostraram resultados positivos com diferentes tonalidades de coloração; já a amostra IV, por não apresentar reação, foi considerada negativa.

No presente trabalho, utilizou-se o método qualitativo, ao avaliar manifestação ou não de coloração após a revelação, independentemente da intensidade da cor. Nas amostras consideradas positivas, o importante foi identificar se o animal era ou não reagente, independentemente da titulação.

4. 4. Teste "dot blotting"

Após a padronização do teste e a definição do antígeno a ser utilizado, tendo como base o antígeno que demostrou os melhores resultados e a melhor distinção entre positivos e negativos, as 1.315 amostras de soro bovino, sem conhecimento prévio dos resultados dos outros testes para diagnóstico da brucelose, foram submetidas ao teste "dot blotting" usando o protocolo estabelecido. Para que a interpretação dos resultados não fosse influenciada, esse teste foi o primeiro a ser realizado, e seus resultados armazenados para futura comparação.

Em cada placa, utilizada como suporte para a reação, quatro poços foram reservados para os controles, dois controles positivos, um forte e um fraco, e dois negativos, sendo utilizadas amostras da padronização e com resultados concordantes

nos testes oficiais. Os controles positivos serviram como parâmetro para saber se o teste foi realizado da maneira correta e para facilitar a interpretação dos resultados, pois demonstram quais tonalidades as amostras positivas poderiam apresentar. Os controles negativos foram utilizados para visualização de possíveis contaminações com o soro de outros poços ou erro de procedimento.

Após a avaliação das amostras no “dot blotting”, os soros passaram pelos testes de antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanaol e fixação de complemento.

4.5. Testes sorológicos

As 1.315 amostras foram avaliadas pelos três testes: AAT, 2-ME e RFC, independentemente do resultado ser positivo ou negativo, para que ao final do trabalho fosse possível realizar a comparação entre os testes e o “dot blotting “.

4.5.1. Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

O teste foi realizado conforme as recomendações do Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006), em ambiente com temperatura de 22ºC, utilizando placas, misturadores e pipetas limpas em água corrente. Dando início à técnica, os soros e o antígeno ficaram em temperatura ambiente por 30 minutos, de forma a atingir a temperatura ambiente. Utilizando um micropipetador automático, foi pipetado sobre a placa de vidro um volume de 30 µL de soro, ao lado da gota de soro foram depositados 30 µL do antígeno próprio para AAT, misturando as gotas até formar uma suspensão homogênea com um diâmetro aproximado de 2 cm.

Em seguida, a placa foi mantida sob movimentos oscilatórios, na frequência aproximada de 30 giros por minuto; a placa foi agitada continuamente por 4 minutos, quando foi feita a leitura, utilizando uma caixa com luz indireta. Na presença de grumos

de aglutinação, o soro foi considerado positivo para brucelose, e na ausência considerado negativo para brucelose bovina.

4.5.2. Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)

Respeitando o PNCEBT (BRASIL, 2006), em cada teste foram incluídos, além dos tubos de soros a serem testados, tubos de controle de antígeno, usando-se soros testados positivos de título conhecido e soro negativo. A reação de 2-mercaptoetanol foi incubada e lida junto com o teste de soroaglutinação (lenta) em tubos.

Para cada amostra de soro testado, foram colocadas em uma estante duas fileiras de quatro tubos, identificando o primeiro tubo de cada fileira com o número correspondente ao soro a testar. A primeira fileira correspondeu às quatro diluições do soro do teste de soroaglutinação lenta em tubos, marcada com uma letra T. Na outra fileira foi realizado o teste do 2-ME, marcado com a letra M. No fundo do primeiro tubo da primeira fileira, foi colocado 0,08 mL de soro, no segundo tubo depositou-se 0,04 mL, no terceiro, 0,02 mL e no quarto, 0,01 mL, depositando as mesmas quantidades na segunda fileira. Foram depositados 2 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em salina fenolada (0,5% de fenol). Posteriormente, na segunda fileira de tubos, foi adicionado 1 mL de solução de 2-ME 0,1 M (diluído em solução salina sem fenol) a cada um dos tubos das fileiras M, misturando-se bem até homogeneizar a solução e deixando-a em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os 30 minutos, foi colocado, em cada tubo da fileira M, 1 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09% de células) em solução salina fisiológica (sem fenol). A concentração final do antígeno na solução foi 0,045%. Os tubos foram colocados em estufa bacteriológica a 37ºC, permanecendo por 48 horas.

A leitura do teste foi feita com uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma forte luz capaz de atravessar os tubos. As interpretações basearam-se no grau de aglutinação do antígeno e na firmeza dos grumos, após agitação suave dos mesmos. A interpretação baseou-se na combinação dos resultados dos testes de

soroaglutinação lenta (SAL) e 2-ME, conforme os quadros 1 e o 2. O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições foi classificado como: completo (+), aquele em que o líquido da mistura soro-antígeno aparece translúcido e a agitação suave não rompe os grumos; incompleto (I), aquele em que a mistura soro/antígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos; ou negativo (–), aquele em que a mistura soro-antígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

QUADRO 1 - Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas com *Brucella abortus* B19 entre três e oito meses de idade (BRASIL, 2004).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤ 50	< 25	Negativo
≥ 100	< 25	Inconclusivo
≥ 25	≥ 25	Positivo

SAL: Teste de soroaglutinação lenta
2-ME: Teste de 2-mercaptoetanol
UI: unidade internacional

QUADRO 2 - Interpretação do teste de 2-mercaptoetanol para diagnóstico de brucelose em fêmeas bovinas não vacinadas com *Brucella abortus* B19 e machos com idade superior a oito meses (BRASIL, 2004).

SAL (UI/mL)	2-ME (UI/mL)	Interpretação
≤ 25	< 25	Negativo
≥ 50	< 25	Inconclusivo
≥ 25	≥ 25	Positivo

SAL: Teste de soroaglutinação lenta
2-ME: Teste de 2-mercaptoetanol
UI: unidade internacional

4.5.3. Fixação de complemento (RFC)

Foi utilizado como antígeno célula integral de *Brucella abortus* amostra 1119/3 inativada pelo calor. A diluição do antígeno foi determinada por titulação em bloco, escolhendo-se como diluição a metade da diluição de reatividade ótima. Como

complemento foi usado uma mistura de soros sanguíneos de várias cobaias. Esse complemento foi titulado como descrito por Alton et al. (1988), usando 20 vezes o volume empregado na microtécnica, para determinar o volume que continha uma unidade hemolítica 50%. Para uso no teste, o complemento foi diluído de modo a conter 5 unidades hemolíticas 50%. Foi empregado sistema hemolítico formado por suspensão de hemácias de carneiro padronizada em espectrofotômetro para a concentração de 0,95 g de hemoglobina por 100 mL, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que consiste de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro, titulada conforme a recomendação de Alton et al. (1988).

Foi empregada a microtécnica com incubação a 37°C por 30 minutos nas duas fases da reação (ALTON et al., 1988). O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U” e foram colocados 25 µL de soro, inativado em banho-maria a 58°C por 30 minutos, em diluições duplas, de 1/2 a 1/128, 25 µL de antígeno e 25 µL de complemento. Em seguida, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, acrescentados 25 µL do sistema hemolítico, e, após agitação em agitador de microplacas, o material foi novamente incubado nas condições mencionadas acima. Imediatamente após a incubação, as placas foram colocadas na geladeira, a fim de interromper a ação do complemento, sendo, em seguida, centrifugadas a 700 G por 5 a 10 minutos.

A leitura foi realizada comparando os resultados com uma escala de hemólise e observando o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante. O título foi obtido pela recíproca da maior diluição do soro com pelo menos 25% de fixação de complemento, sendo considerado positivo o soro com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4 (ALTON et al., 1988).

4.6. Análise dos dados

A base de dados e a construção de tabelas e gráficos foram realizadas usando as planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel versão 2007. Todas as informações extraídas das fichas encaminhadas, junto com as amostras de soro sanguíneo bovino, ao Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como: município e propriedade de origem, veterinário responsável, data de coleta e sexo, foram tabeladas, além dos resultados obtidos nos testes de AAT, RFC, 2-ME e "dot blotting".

Para os cálculos de sensibilidade, especificidade foi utilizada a Tabela 1 e as equações abaixo da mesma, conforme as recomendações de Thrusfield (2005). Os intervalos de confiança (IC) também foram obtidos seguindo os critérios recomendados por Thrusfield (2005).

TABELA 1 - Classificação para cálculo de sensibilidade e especificidade

	Teste de Referência	
"Dot Blotting"	Positivo	Negativo
Positivo	A	C
Negativo	B	D

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{A+B} x100 \qquad \text{Especificidade} = \frac{D}{D+C} x100$$

Para verificar a existência de viés empregou-se o teste de qui-quadrado de McNemar (ZAR, 1999). Calculou-se o coeficiente *kappa*, que mede a concordância entre dois testes e baseia-se na comparação das porporções de concordância esperada (pe) e de concordância observada (po) (TAYLOR, 1992), utilizando como meio de interpretação desses dados os critérios adotados por PEREIRA (2000), conforme o Quadro 3. Foi utilizado o teste Z para avaliar a significância do indicador

kappa, sendo estabelecida a hipótese nula monocaudal kappa não difere de zero. Os cálculos foram executados usando o software R.

QUADRO 3 - Interpretação da concordância pelo coeficiente *Kappa*, segundo PEREIRA (2000).

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1. Padronização do teste “dot blotting”

Na padronização, a forma que proporcionou o melhor resultado para membrana foi círculo, devido ao uso reduzido de material, tornando-se uma forma econômica, de fácil obtenção, pela possibilidade de utilizar um perfurador de papel devidamente higienizado na confecção dos círculos, e desta forma, pouca perda na formulação, além de o formato proporcionar boa agitação nas soluções utilizadas na técnica. Towbin, Staehelin e Gordon (1979) afirmaram que o uso de nitrocelulose em técnicas de diagnóstico permite melhor capacidade de detectar substrato, destacando que a membrana é altamente sensível e específica (PINHEIRO, 2001).

Dos antígenos testados, o obtido da bactéria *Brucella abortus* após passar por um processo de ruptura do microrganismo proporcionou o melhor resultado, sendo este utilizado no teste das 1.315 amostras do presente trabalho. Além de proporcionar alto rendimento e ser de fácil aquisição, na padronização demonstrou-se mais eficaz e eficiente, apresentando melhor distinção na visualização dos resultados das amostras positivas e negativas.

O suporte que permitiu a melhor agitação, não demostrando competição com a membrana, foi a placa de cultivo celular de 24 poços e fundo chato, que é de material hidrofóbico, de fácil acesso.

Foi utilizada a diluição do soro sanguíneo estabelecida na padronização, de 1:100, por necessitar de menor quantidade de soro, tornando-se a mais adequada e fácil de ser utilizada na rotina de laboratórios de sorologia, dado que todas as diluições testadas proporcionaram o mesmo resultado. Diluição semelhante foi estabelecida por Almeida, Olive e Resende (2000) na padronização do “dot blotting” para detecção do vírus do mosaico comum em milho. Para o conjugado, IgG de coelho anti-IgG total de bovino ligada a fosfatase alcalina, foi estabelecida a diluição de 1:30.000. Uma vez que todas as diluições proporcionaram a mesma nitidez de coloração ao final da técnica, foi adotada a que exige menor quantidade de reagente.

O número de lavagens que proporcionou melhor resultado ao final das etapas, deixando a reação mais nítida, foi de três lavagens por etapa, sendo cada lavagem de 5 minutos.

Na interpretação dos resultados, foram considerados reativos, positivos para brucelose, todos os soros que desenvolveram uma coloração, fraca ou forte, e não reativos, negativos, os que não apresentaram reação, como ilustrado na Figura 2.

O teste não necessitou de equipamento específico e não gerou risco à saúde do manipulador, pois sua leitura foi realizada pela visualização da manifestação ou não de cor da membrana sensibilizada, sendo os materiais utilizados não nocivos ao manipulador.

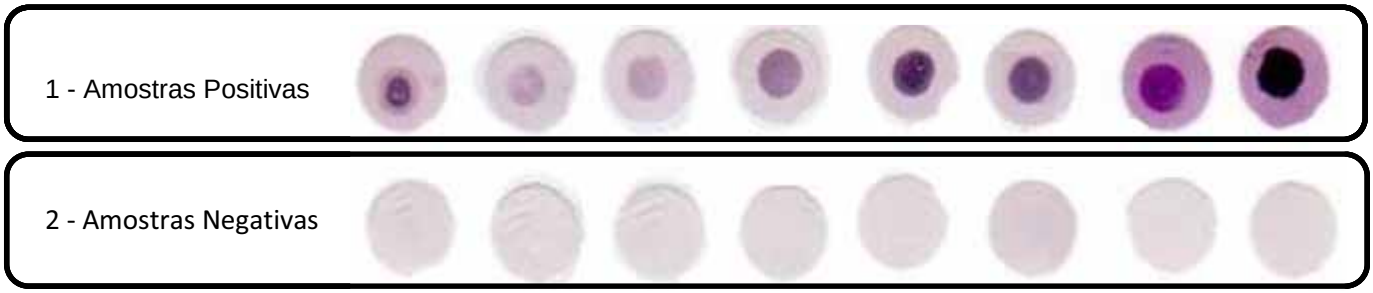


FIGURA 2 – Resultados observados na técnica “dot blotting” para diagnóstico de brucelose em bovinos. As membranas da fileira 1 demostraram resultados positivos com diferentes tonalidades de coloração, e na fileira 2 membranas com resultados negativos, sem reação de cor.

5. 2 Teste “dot blotting”

Com o protocolo estabelecido, o teste foi realizado nas 1.315 amostras, observando-se facilidade na realização da técnica e que a utilização de controles proporcionou segurança na interpretação dos resultados; os controles negativos atestaram ausência de contaminação, e que não houve erro nas diluições e lavagens, mantendo a coloração inicial da membrana. Os controles positivos atestaram que a técnica foi realizada da maneira correta. Dada a característica quantitativa do “dot blotting”, a utilização de um controle com alta titulação e outra com baixa titulação proporcionou a visualização das tonalidades que as amostras positivas poderiam

adquirir, como ilustrado na Figura 3. Assim como Aragão (2007), que, ao empregar a técnica no diagnóstico sorológico de Maedi-Visna, verificou uma distinção precisa entre os soros positivo e negativo e que a utilização de controles na reação gerou maior segurança na interpretação dos resultados.

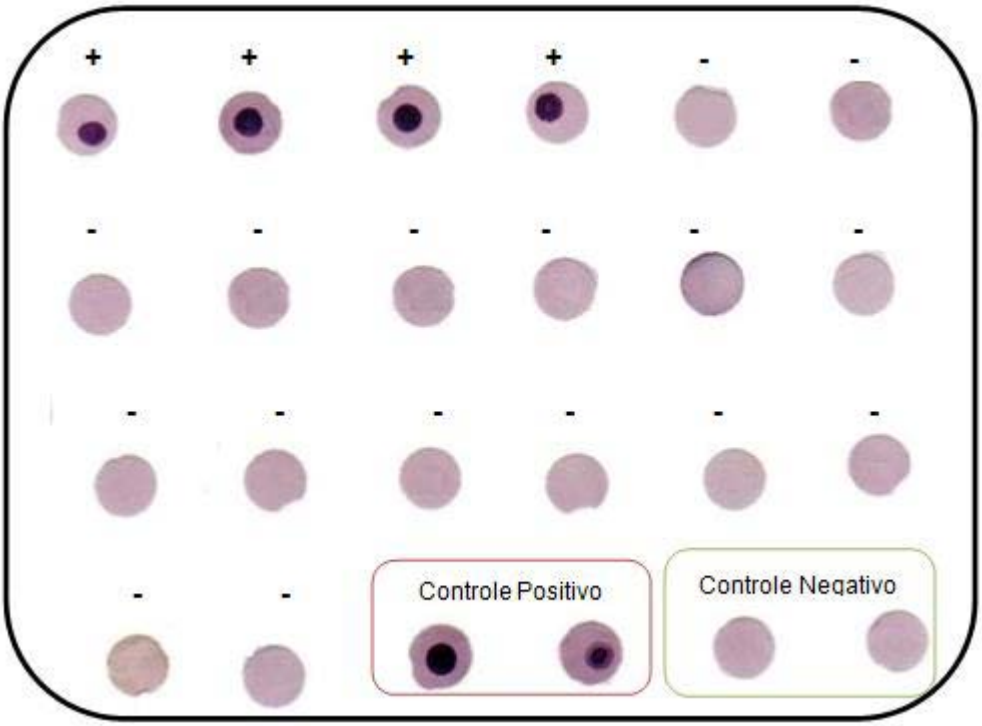


FIGURA 3 - Resultado de uma placa do teste de "dot blotting" para diagnóstico de brucelose em bovinos, contendo dois controles negativos e dois controles positivos.

5. 3. Comparação entre os testes

Das 1.315 amostras testadas, 225 (17%) foram positivas no AAT, 192 (14,6%) no 2-ME, 145 (11%) na RFC e 204 (15,5%) no "dot blotting". Além de 24 amostras (1,8%) com resultado inconclusivo no 2-ME e 18 (1,3%) com resultado anticomplementar na RFC, conforme ilustrado na Figura 4.

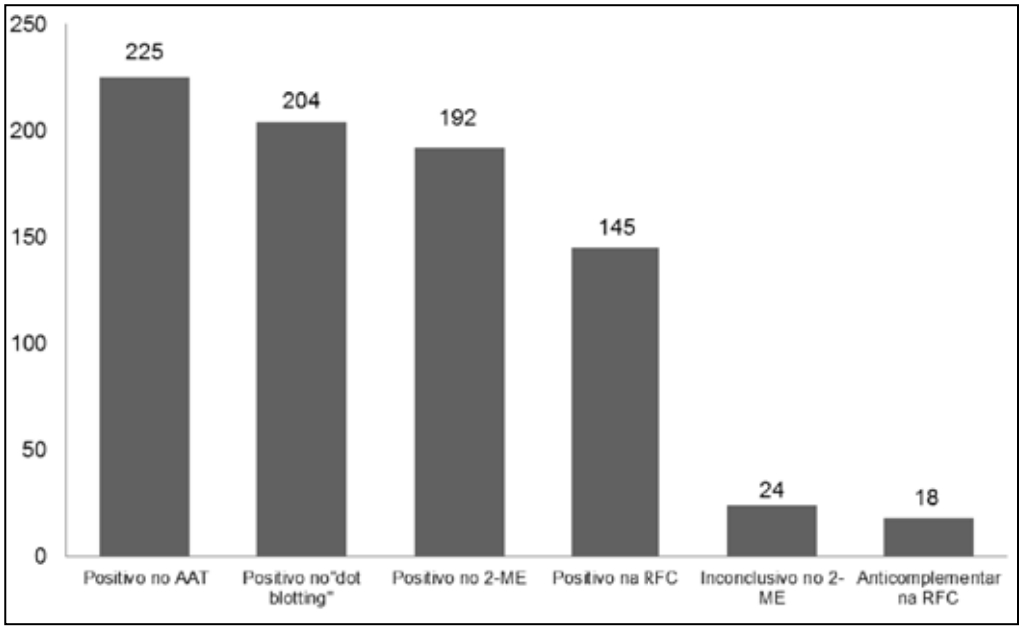


FIGURA 4 – Gráfico de número de amostras por resultado dos testes de AAT, RFC, 2-ME e "dot blotting" de 1.315 amostras de soros sanguíneos de bovinos para diagnóstico de brucelose.

Assim como no presente trabalho, Batra et al. (1988) compararam os resultados do "dot blotting" com os dos testes de antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento para brucelose bovina. De 127 soros testados, 79 (62,20%) deram resultado positivo no teste "dot blotting", 78 (61,41%) soros foram positivos no teste de fixação de complemento e 72 (56,70%) no teste de antígeno acidificado tamponado, resultados proporcionalmente compatíveis com os encontrados no presente trabalho. Com esses resultados, os autores descrevem que o teste "dot blotting" é adequado para a detecção de anticorpos contra *Brucella* no soro bovino, concluindo que o ensaio pode ser utilizado em conjunto com outros métodos sorológicos tradicionais.

Essas descrições reforçam a potencialidade do "dot blotting" para diagnóstico da brucelose bovina, ressaltando seus bons resultados, além de boa relação custo-benefício, devido ao fato de ser um teste de fácil execução e com similaridade de resultados com os encontrados nos testes sorológicos tradicionais utilizados para o diagnóstico da brucelose.

Ao comparar os resultados encontrados nos testes de AAT, RFC, 2-ME e “dot blotting”, observou-se que 1.063 (80,83%) amostras foram negativas no AAT, 2-ME, RFC e “dot blotting”, 136 (10,34%) foram positivas no AAT, 2-ME, RFC e “dot blotting”, 49 (3,72%) positivas no AAT, 2-ME, “dot blotting” e negativas na RFC, 23 (1,75%) positivas só no AAT, 11 (0,84%) negativas no AAT, 2-ME, “dot blotting” e anticomplementar no RFC, 10 (0,76%) negativas no AAT, RFC, “dot blotting” e inconclusivas no 2-ME. Além disso, 9 (0,68%) positivas no AAT, RFC, "dot blotting" e inconclusivo no 2-ME, 4 (0,30%) positivas no AAT, 2-ME, "dot blotting" e anticomplementar na RFC, 3 (0,23%) negativas no AAT, RFC e positivas no 2-ME e "dot blotting", 2 (0,15%) positivas no AAT, negativas no RFC, "dot blotting" e inconclusivo no 2-ME, 2 (0,15%) negativas no AAT, positivas no "dot blotting", inconclusivas no 2-ME e anticomplementar no RFC, 1 (0,07%) negativa no AAT, 2-ME, RFC e positiva no "dot blotting”, 1 (0,07%) positiva no AAT, 2-ME e negativa no RFC e "dot blotting", e 1 (0,07%) positiva no AAT, "dot blotting", negativa na RFC e inconclusiva no 2-ME, como detalhado na Tabela 2.

Tabela 2 - Associações de resultados obtidos nos testes de antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol, fixação de complemento e “dot blotting” das 1315 amostras do presente estudo, realizado na UNESP Câmpus Jaboticabal, nos anos de 2013 e 2014.

Nº de soros	AAT	2-ME	RFC	"Dot Blotting"
1.063	-	-	-	-
136	+	+	+	+
49	+	+	-	+
23	+	-	-	-
11	-	-	A	-
10	-	I	-	-
9	+	I	+	+
4	+	+	A	+
3	-	+	-	+
2	+	I	-	-
2	-	I	A	+
1	+	+	-	-
1	-	-	-	+
1	+	I	-	+
Total 1.315				

Legenda:
+ Resultado positivo no teste
- Resultado negativo no teste
I Inconclusivo
A Anticomplementar

Assim como descrito por Meirelles-Bartoli e Mathias (2010), não se pode desconsiderar a ocorrência de resultados divergentes entre os testes confirmatórios, com presença de soros apresentando resultado negativo em um teste e título elevado no outro, indicando a possibilidade de ocorrência de falso-negativo nos testes confirmatórios.

Comparando os resultados obtidos entre os testes oficiais e o da técnica “dot blotting”, obteve-se boa concordância, semelhante à observada por Kuroda et al. (2004), que compararam dois testes confirmatórios oficiais do Brasil, 2-ME e RFC para diagnóstico da brucelose bovina, obtendo uma concordância de 97,8% e índice *Kappa* de 0,97.

A boa concordância entre os testes oficiais e o “dot blotting” permite deduzir que essa técnica poderia ser uma opção para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

5. 3. 1. Comparação entre os testes AAT e “dot blotting”

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos nos testes de AAT e “dot blotting”, adotou-se o teste de AAT como referência para comparação, como demostrando na Tabela 3. Nessa circunstância, obtiveram-se os valores de sensibilidade de (0,880) 88% (IC 95%: 83,75% - 92,25%), especificidade de (0,994) 99,45% (IC 95%: 98,8% - 99,75%), índice *Kappa* de 0,9081 (IC 95%: 0,8542 – 0,9621), concordância considerada ótima. A diferença entre as proporções de resultados positivos nos dois testes foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 13,36 (P = 0,00026), sugerindo a existência de viés, indicando restrição ao uso do kappa. Pelo teste Z (32.99; P = $6{,}08 \times 10^{-239}$), verificou-se que kappa foi significativamente maior que zero, mostrando concordância entre os testes.

Resultados semelhantes foram encontrados por Herbeling e Kalter (1986), que compararam o “dot blotting” ao teste de vírus neutralização para diagnóstico do vírus da raiva, registrando índice *Kappa* de 0,93, e Pinheiro, Olortegui e Gouveia (2006), que

compararam o “dot blotting” com o ELISA-i para diagnóstico do vírus da artrite encefalite caprina, obtiveram índice *Kappa* de 0,90.

TABELA 3 - Comparação entre os testes de antígeno acidificado tamponado (AAT) e “dot blotting”, para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando o AAT como referência na comparação.

“Dot Blotting”	**Antígeno Acidificado Tamponado**		**Total**
	Positivo	Negativo	
Positivo	198	6	204
Negativo	27	1.084	1.111
Total	225	1.090	1.315

Sensibilidade = 88% (IC 95%: 83,75% - 92,25%); Especificidade = 99,45 % (IC 95%: 98,8% - 99,75%); *kappa* = 0,908 (IC 95%: 0,8542 - 0,9621).

5. 3. 2. Comparação entre os testes 2–mercaptoetanol e “dot blotting”

Comparando os resultados obtidos nos testes de 2-ME e “dot blotting”, utilizando o teste de 2-ME como o padrão-ouro, como demonstrado na Tabela 4, obtiveram-se os valores de sensibilidade de (0,994) 99,48% (IC 95%: 97,11% - 99,91%), especificidade de (0,999) 99,91% (IC 95%: 99,49% - 99,989%), índice *Kappa* de 0,9939 (IC 95%: 0,939 – 1,0484), concordância considerada ótima. A diferença entre a proporção de positivos nesses resultados não foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 0 (P = 1). O teste Z (35,71; P = $1,35x10^{-279}$) mostra que *Kappa* >0 .

Resultado semelhante foi encontrado por Bastos (2011), ao comparar os testes de 2-ME e “dot blotting” para diagnóstico de brucelose bovina, encontrando 100% de sensibilidade, 97,6% de especificidade e 0,977 de índice *kappa*.

Os resultados do presente trabalho se mostraram diferentes dos de Requejo et al. (1994), que, ao comparar os resultados do teste de “dot blotting” para *Omniserum pneumococico* com os resultados de cultura bacteriana, contraimunoeletroforese e látex-aglutinação, observaram valores de 0,940 (94%) para sensibilidade, 0,830 (83%)

para especificidade e 0,760 de índice *Kappa*, resultados que, segundo os autores, comprovaram que o teste é uma alternativa prática e eficaz de diagnóstico. Mesmo com valores de sensibilidade e especificidade inferiores aos encontrados neste trabalho, os autores puderam verificar a eficácia em relação aos diagnósticos clássicos, ressaltando a potencialidade do "dot blotting" para detecção de anticorpos.

TABELA 4 - Comparação entre os testes de 2-mercaptoetanol (2-ME) e "dot blotting" para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando o 2-ME como padrão-ouro na comparação.

"Dot Blotting"	**2-mercaptoetanol**		**Total**
	Positivo	Negativo	
Positivo	191	1	192
Negativo	1	1.098	1.099
Total	192	1.099	1.291

Sensibilidade = 99,48% (IC 95%: 97,11% - 99,91%); Especificidade = 99,91% (IC 95%: 99,49% - 99,989%); *kappa* = 0,993 (IC 95%: 0,9393 - 1,0484).

O teste de 2-mercaptoetanol apresenta alguns inconvenientes, como o prolongado tempo de incubação, 48 horas, necessário para a obtenção do resultado, o fato de usar grandes volumes de reagentes, ser trabalhoso e usar substância cancerígena na sua formulação, o mercaptoetanol (NIELSEN, 1995), além do fato de que a prova de 2-ME deve ser realizada juntamente com a prova de SAL, que utiliza fenol em sua formulação, e necessita de grande quantidade de materiais e reagentes.

Outro problema encontrado foi a falta do antígeno necessário para realização do 2-ME. A falta de um diagnóstico rápido e concreto permite que animais positivos continuem nos planteis e em contato com outros animais e trabalhadores, prejudicando a pecuária brasileira e, dessa forma, a economia do país.

5. 3. 3. Comparação entre os testes fixação de complemento e “dot blotting”

Ao comparar os resultados obtidos nos testes fixação de complemento e “dot blotting”, adotando como padrão-ouro a RFC, como demonstrado na Tabela 5, obtiveram-se como resultado os valores de sensibilidade de (1,0) 100% (IC 95%: 97,42% - 100,0%), especificidade de (0,954) 95,40% (IC 95%: 94,03% - 96,47%), índice *Kappa* de 0,8226 (IC 95%: 0,7690 – 0,8761), concordância considerada ótima. A diferença entre as proporções de resultados positivos foi significativa pelo teste de McNemar, com X^2 igual a 53 ($P = 3{,}335 \times 10^{-13}$), indicando a ocorrência de viés. Pelo teste Z (30,1; $P = 2{,}29 \times 10^{-199}$), aceita-se a hipótese alternativa, portanto, *Kappa* >0.

TABELA 5 - Comparação entre os testes de fixação de complemento (RFC) e “dot blotting” para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina, utilizando a RFC como padrão-ouro na comparação.

“Dot Blotting”	**Fixação de Complemento**		**Total**
	Positivo	Negativo	
Positivo	145	53	198
Negativo	0	1.099	1.099
Total	145	1.152	1.297

Sensibilidade = 100% (IC 95%: 97,42% - 100,0%); Especificidade = 95,40% (IC 95%: 94,03% - 96,47%); *kappa* = 0,822 (IC 95%: 0,7690 - 0,8761).

Camargo et al. (1992) também encontraram bons resultados ao comparar o teste de “dot blotting” com o teste de ELISA para toxocaríase, obtendo sensibilidade do “dot blotting” de 95,4% a 100% e especificidade de 85,7% a 97,6%.

Estudos realizados em bovinos infectados, natural e experimentalmente, indicaram que a RFC apresenta boa associação com o isolamento do agente etiológico (CHAPPEL, 1989), fato que demonstra que a utilização desse teste como referência para a avaliação de outro teste sorológico é válida, além de ser mais seguro e adequado quando há grande número de amostras a serem testadas (DAJER et al., 1999). Esses fatos ressaltam a importância da comparação entre os testes RFC e “dot

blotting", assim como os bons resultados encontrados na comparação, validando a viabilidade da utilização do "dot blotting".

Apesar das vantagens da RFC, esse teste apresenta dificuldades, por ser uma técnica complexa, trabalhosa e que exige pessoal treinado e reagentes lábeis (DAJER et al., 1999), ao contrário do "dot blotting", que é um teste de fácil realização e que utiliza reagentes passíveis de armazenamento e com longa validade.

5. 3. 4. Comparação entre a condição verdadeira do animal, determinada pela combinação dos resultados da prova do 2-mercaptoetanol e da reação de fixação de complemento, e o teste "dot blotting"

A comparação ideal para determinar a sensibilidade e especificidade de um teste de diagnóstico sorológico para brucelose bovina é pelo isolado do agente etiológico, mas devido às dificuldades e restrições para utilização desta técnica, a alternativa mais prática e confiável consiste na determinação da sensibilidade e especificidade relativa, utilizando a associação de testes confirmatórios oficiais empregados para estabelecer a sanidade do animal em relação à brucelose (MEIRELLES, 2008).

Na tabela 6, encontra-se a comparação entre os resultados obtidos pelo teste de "dot blotting" e a condição verdadeira do animal estabelecida a partir das amostras que obtiveram os mesmos resultado nos testes de RFC e 2-ME. Os animais com resultado positivo nesses dois testes, foram considerados infectados, e os animais com resultados negativos nesses dois testes foram considerados não infectados. Todos os 136 animais considerados infectados por esse critério foram positivos no "dot blotting", resultando em sensibilidade relativa de 100% (IC 95%: 97,25% - 100,00%), e dos 1.087 animais classificados como não infectados 1.086 foram negativos no "dot blotting", o que resulta em especificidade relativa de 99,91% (IC 95%: 99,48% - 99,98%).

TABELA 6 - Resultados do teste “dot blotting” em comparação com a condição verdadeira do animal determinada pela combinação dos resultados da prova do 2-mercaptoetanol e da reação de fixação de complemento, para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

“Dot Blotting”	**2-ME + RFC**		**Total**
	Infectado	Não Infectado	
Positivo	136	1	137
Negativo	0	1.086	1.086
Total	136	1.087	1.223

Sensibilidade de 100% (97,25% - 100,00%); Especificidade de 99,91% (99,48% - 99,98%).

Meirelles (2008) encontrou resultados diferentes ao comparar os resultados do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol como a associação dos testes de 2-ME e RFC, observando uma sensibilidade relativa do AAT-RIV de 76,5% e uma especificidade relativa de 100%. O “dot blotting” apresentou valores mais expressivos de sensibilidade e especificidade relativa, semelhantes aos dos testes confirmatórios oficiais.

Apesar de trabalhar com uma espécie diferente de *Brucella* spp., Ghorbanpoor et al. (2006) obtiveram 80% de sensibilidade, 100% de especificidade e concordância de 98,9% quando compararam o teste de “dot blotting” com o isolamento do agente para diagnóstico de infecção por *Brucella melitensis*, ressaltando a viabilidade da técnica e demonstrando a possibilidade do uso do “dot blotting” para diagnóstico de brucelose em outras espécies animais.

Novas técnicas de diagnóstico estão surgindo, no entanto, muitas têm se inviabilizado no uso de rotina, pela utilização de equipamentos de alto custo, além de necessitar de equipes altamente treinadas, fatores não necessários na técnica padronizada no presente estudo.

O “dot blotting” apresenta vantagens sobre outros ensaios de ligação primária. Nesta técnica, o antígeno adere ao centro da membrana de nitrocelulose, fato que assegura a utilização de uma concentração estabelecida do antígeno, e sua simplicidade, precisão e rapidez demonstram que o ensaio pode ser usado no campo para diagnóstico em grande escala em programas de erradicação, como o da brucelose bovina (BATRA et al., 1988).

É um teste atrativo para diagnóstico de rotina, pois a membrana de nitrocelulose tem alta afinidade por proteínas, sendo eficaz para identificar corretamente indivíduos reagentes (positivos) e não reagentes (negativos) a um agente etiológico (PINHEIRO, 2001). A eficácia de programas de controle depende da sensibilidade e da especificidade dos testes de diagnóstico, e o “dot blotting” é um teste com ambas as qualidades (PINHEIRO, 2001).

Assim como relataram Godfroid et al. (2013), o estudo da brucelose serviu e serve como base para alguns dos grandes avanços da epidemiologia, e o desenvolvimento e a comprovação de bons resultados de um diagnóstico disponibiliza a técnica não só para a doença em questão como abre espaço para avaliação e padronização do teste para outras espécies e outras infecções.

6. CONCLUSÃO

O “dot blotting”, padronizado no presente estudo, apresentou alta sensibilidade relativa e alta especificidade relativa, tendo uma boa concordância com os testes AAT, 2-ME e RFC, conseguindo detectar anticorpos contra *Brucella abortus* em soro bovino. É um teste viável, de fácil execução e interpretação, além de seguro para o manipulador, sendo apropriado para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina.

REFERÊNCIAS[1]

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. ilust. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud: Organización Mundial de la Salud, 2001. v. 1, Bacteriosis y micosis. 398 p., il. (Publicación Científica y Técnica, 580). Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0036-46652001000600015&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Accesible: 05 out. 2014.

ALMEIDA, A. C.; OLIVE, E.; RESENDE, R. Detecção de vírus por RT-PC R, hibridização "DOT-BLOT" E DOT-ELISA em milho com mosaico comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 168-174, 2000.

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

ANTUNES, J. M. A. de P.; MEGID, J. *Brucella ovis*: invasão, tráfego, fatores de virulência e resposta imune. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1301-1312, 2013.

ARAGÃO, M. A. C. **Desenvolvimento e padronização do DOT-ELISA para o diagnóstico sorológico da Maedi-Visna**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

BAHIA (Estado). [Secretaria da Saúde. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde]. **Manual de biossegurança**. Salvador, 2001. Disponível em: <https://www.google.com.br/search?q=Manual+de+Biosseguran%C3%A7a+ufba+2001.&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=LVnTVN-rCIvIsASUpoHIAQ >. Acesso em: 10 fev. 2014.

BAKER, P. J.; WILSON, J. B. Hypoferremia in mice and it´s application to the bioassay of endotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 90, n. 4, p. 903-910, 1965.

[1] Referencias de acordo com às normas da ABNT- NBR 6023/2002 (ABNT) - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p. Disponível em: <http://www.abntcolecao.com.br> . Acesso em: 05 fev. 2015.

BASTOS, C. R. **Padronização do teste de dot blotting para diagnostico de brucelose em ovinos**. 2011. 40 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BATRA, H. V.; CHAND, P.; GANJU, l.; MUKHERJEE, R.; SADANA, J. R. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies in bovine brucellosis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 1, n. 46, p. 143-146, 1988.

BATTEIGER, B.; NEWHALL, W. J.; JONES, R. B. The use of tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. **Journal of lmmunological Methods**, Amsterdam, v. 1, n. 55, p. 297-307, 1982.

BERCOVICH, Z. Maintenence of *Brucella abortus*–free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. **Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 20, n. 3, p. 81-88, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 6, de 8 de janeiro de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 27, de 20 de outubro de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 out. 2010. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**: manual técnico. Brasília, DF, 2006. 184p. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.agricultura.gov.br%2Farq_editor%2Ffile%2FAniamal%2Fprograma%2520nacional%2520sanidade%2520brucelose%2FManual%2520do%2520PNCEBT%2520-%2520Original.pdf&ei=QV3TVJXCKujjsASJzoGwAw&usg=AFQjCNGWQ8eIBzZJj26s2zA9TZ_e3_lcmw&sig2=LZwbKbgyGjNCyx6oJ-NTuA&bvm=bv.85464276,d.cWc&cad=rja>. Acesso em: 20 jun. 2013.

CAMARGO, E. D.; NAKAMURA, P. M.; VAZ, A. J.; SILVA, M. V.; CHIEFFI P. P.; MELO, E. O. Stantardization of Dot-Elisa for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 55-60, 1992.

CHAPPEL, R. J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. **Surveillance**, Wellington, v. 16, n. 2, p. 03-05, 1989.

CORBEL, M. J.; ELBERG, S. S.; COSIVI, O. (Ed.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO Press, 2006. 89 p.

CORRÊA, R. L. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal - PNCEBT**: análise saúde-saúde da brucelose animal. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Economia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIERREZ, E.; PENA, G.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 1, n. 40, p. 67-73, 1999.

DIAS, H. L. T.; MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E. S. C. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropedica, v. 22, n. 2, p. 41-44, 2002.

FARIA, G. C. **Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos sorológicos de bezerras vacinadas com amostra B19 de *Brucella abortus***. 2010. 31 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FENOLL, A. I.; JADO, D.; VICIOSO, J. Dot blot assay for the serotyping of Pneumococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 35, n. 3, p. 764-766, 1997.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERT, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 2, p. 2688–2693, 2007.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; CORRÊA, E. J. S.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. O. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 101-102, 2001.

GEORGIEVA, M. A Dot-immunobinding assay to detect antibodies against avian reoviruses. **Experimental Pathology and Parasitology**, Sofia, v. 518, n. 1, p. 35-38, 2002.

GHORBANPOOR, M.; SEYFIABAD SHAPOURI, M. R.; GORANINEJAD, S.; JALALI, E. Comparison of Dot-ELISA with microbial culture for detection of *Brucella* spp. in clinical specimens. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v. 7, n. 3, p. 73-75, 2006.

GODFROID, J.; GARIN-BASTUJI, B., SAEGERMAN C.; BLASCO J. M. Brucellosis in terrestrial wildlife. **Scientific-Technical Review (International Office of Epizootics)**, Belgrade, v. 32, n. 1, p. 27-42, 2013.

HERBELING, R. L.; KALTER, S. S. Rapid dot-immunbinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 23, n. 1, p. 109-113, 1986.

HUBER, J. D.; NICOLETTI, P. Comparison of the results of card, rivanol, complement-fixation, and milk ring tests with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 47, n. 7, p. 1529-31, 1986.

KURODA, R. B. S.; PAULIN, L. M. S.; NOZAKI, C. N.; SILVA JUNIOR, F. F.; GERONUTTI, L.; MEGID, J. Prevalência da brucelose bovina na microrregião da serra de Botucatu – estudo comparativo dos resultados das técnicas de soroaglutinação lenta em tubos, 2mercaptoetanol e fixação de complemento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 137-142, 2004.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A. S.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Bovine brucellosis: an updated review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.

LIN, T.; HALBERT, S. R. P. Rapid dot enzyme immunoassay for the detection of antibodies to cytomegalo virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC., v. 24, n. 1, p. 7-11, 1986.

MATHIAS, L. A.; CORBELLINI, L. G.; NASCIMENTO, K. F.; PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L. E.; SERQUEIRA, M. A.; FILHO, P. M. S.; SOUZA, M. M. A. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2135-2140, 2010.

MCGIVEN, J. A. New developments in the immunodiagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Scientific and Technical Review (International Office of Epizootics)**, Belgrade, v. 32, n. 1, p. 163-176, 2013.

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

MEIRELLES, R.B. **Avaliação do teste do antígeno acidificado tamponado em soros tratados com rivanol como teste confirmatório no diagnóstico sorológico da brucelose bovina.** 2008. 86 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; MATHIAS, L. A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 11-17, 2010.

MINHARRO, S. B. **Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isolada de bovinos no Brasil**. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MISTRELLO, G.; GENTILI, M.; FALAGIANI, P.; RONCAROLO, D.; RIVA, G.; TINELLI, M. Dot immunobinding assay as a new diagnostic test for human hydatid disease. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 79-85, 1995.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TÚRY, E.; SOUZA, J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 157-162, 1997.

MONTEIRO, L. A. R. C. **Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul**. 2004. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 9-17, 1995.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.

PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 105-112, 2002.

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

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia**: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 596 p.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G. Desenvolvimento de Dot-Blot para detecção de anticorpos para o vírus da artrite encefalite caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisbon, v. 101, n. 3, p. 51-56, 2006.

PINHEIRO, R. R. **Vírus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. 2001. 115 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)– Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 1-5, 2009.

REQUEJO, H. I. Z.; ALKMIN, M. G.; ALMEIDA, R. G.; CASAGRANDE, S. T.; COCOZZA, A. M.; LOTUFO, J. P. B.; WAETGE, A. R. P.; RODRIGUES, J. Dot-Enzyme-Linked Immunisorbent assay (Dot-Elisa) for detection of pneumococcal polysaccharide antigens um pleural fluid eddusion samples. Comparison with bacterial culture, counter immunoelectrophoresis and latex agglutination. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 531-537, 1994.

RIBEIRO, A. R. P. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 55, n. 1, p. 120-122, 2003.

ROJAS, X. M. V.; ALONSO, O. T. M.; QUIÑONES, A. T. M.; SOTO, L. B. Q. T. M. Proposicion de uma técnica de enzimoensayo em papel de nitrocelulosa para el diagnostico de brucelosis. **Archives of Medicine Veterinary**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 149-150, 1986.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959. 238 p.

SCHOLZ, H. C.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A. *Brucella*: relationship to other Alphaproteobacteria, current taxonomy and the emergence of new species. In: LÓPEZ-GONI, I.; O'CALLAGHAN, D. ***Brucella***: molecular microbiology and genomics. Norfolk, Uk: Caister, 2012. 13 p.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 1-14, 2008.

TAYLOR, R. N. **Measurement of variation and significance in serological test**. [S.l.]: Academic Press, 1992. 29 p.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 3. ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2005. 610 p.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot Immunobinding - current status and Outlook. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 313- 340, 1984.

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**, Washington, DC, v. 76, n. 2, p. 4350-4354, 1979.

VAZ, A. J.; FERREIRA, A. W.; CAMRGO, M. E.; NAKAMURA, P. M.; CAMARGO, E. D. Dot-Elisa for detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in human cerebrospinal fluid using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics). Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 355-359, 1990.

WYATT, H. V. Lessons from the history of brucellosis. **Scientific and Technical Review (International Office of Epizootics)**, Belgrade, v. 32, n. 1, p. 17-26, 2013.

Zar J. H. **Biostatistical Analysis.** 4. ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1999. 663p.