

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E ESPACIAL DE ESPÉCIES
DO GÊNERO BRUCELLA DA REGIÃO LEITEIRA DO NORTE DA ANTIOQUIA,
COLÔMBIA**

Olga Lucía Herrán Ramirez

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E ESPACIAL DE ESPÉCIES
DO GÊNERO BRUCELLA DA REGIÃO LEITEIRA DO NORTE DA ANTIOQUIA,
COLÔMBIA**

OLGA LUCÍA HERRÁN RAMIREZ

Sob a Orientação da Professora

Dra. Isabele da Costa Angelo

e Coorientação do Professor

Dr. Huarrisson Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor
em Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Março de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R165e Ramirez, Olga Lucia Herrán , 1984-
ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E ESPACIAL DE
ESPÉCIES DO GÊNERO BRUCELLA DA REGIÃO LEITEIRA DO
NORTE DA ANTIOQUIA, COLÔMBIA / Olga Lucia Herrán
Ramirez. - SABANETA, 2022.
145 f.

Orientadora: Isabele da Costa Angelo.
Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS, 2022.

1. Brucelose bovina. 2. Surto. 3. Epidemiologia .
4. qPCR. 5. Colombia. I. da Costa Angelo, Isabele ,
1981-, orient. II. Azevedo Santos, Huarrisson, 1980-
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1297/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.023606/2022-60

Seropédica-RJ, 18 de abril de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

OLGA LUCIA HERRAN RAMIREZ

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 18/04/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 19/04/2022 08:23)

CLAYTON BERNARDINELLI GITTI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: 2181418

(Assinado digitalmente em 18/04/2022 19:19)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: 3701492

(Assinado digitalmente em 18/04/2022 16:28)

WAGNER DE SOUZA TASSINARI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DepM (12.28.01.00.00.00.63)
Matricula: 2545823

(Assinado digitalmente em 18/04/2022 20:28)

MARIEL ASBURY MARLOW
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: 488621544

(Assinado digitalmente em 23/05/2022 16:48)

MARLYN ROMERO PENUELA
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: AQ037202

¡El esfuerzo nunca te traiciona!



Que toda honra e glória seja sempre para Deus, por me usar como um instrumento e me mostrar o caminho certo para atingir o verdadeiro propósito da minha existência. À Virgem Maria, que como mulher, compreende a minha fragilidade, intercede por mim e responde sempre as minhas orações.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Agradeço à minha linda mãe, que me deu forças para continuar no doutorado até que eu conseguisse voltar para seu lado. Ao meu maravilhoso pai, pelo seu apoio incondicional e pela sua grande diplomacia, que me ajudou a conseguir as permissões do governo para a realização do curso, bem como as licenças necessárias para a importação de amostras para o Brasil. Faço questão de fazer uma menção especial à minha irmã Angélica, que, embora não tenha sido incluída em meus artigos, foi fundamental para as minhas publicações, além de ter me dado suporte emocional. Agradeço à minha irmã Lorena pelo apoio e por estar sempre cuidando de mim, além de assumir as responsabilidades relacionadas à nossa mãe. Ao meu grande companheiro de vida e melhor amigo Steven, juntamente com nosso filho Miguel Angel e nosso cachorro Chapi, pois juntos fizemos este doutorado em família. Agradeço também minha sogra, que cuidou da minha mãe durante a minha ausência, me dando a tranquilidade que eu precisava para me concentrar neste objetivo.

Agradeço a cada pessoa que acreditou em mim, que viu meu potencial e meu desejo de crescer e contribuir com a sociedade. Estou profundamente grata aos meus colegas que contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa: Aarón Sierra, Patrícia Gonzaga, Jose Luís Rodriguez, Juliana Gonzales, Lorena Jaramillo, Oscar Mario Cardona, Mariluz Villamil, Luís Rua, Eugenia Pérez, Rene Ramirez, Marlyn Romero. Agradeço também à equipe Lasave, composta por profissionais de sucesso que me acolheram com apoio e carinho. À OEA e a UFRRJ, por terem me dado a oportunidade de alcançar este objetivo profissional. Ao Brasil por me acolher e me fazer sentir em casa e aos grandes amigos brasileiros, que irão voltar comigo, dentro do meu coração: Letícia, Débora, Patrícia, Tays, Carolina, Naty e Caroline obrigada pelo apoio e pelo conhecimento compartilhado. Finalmente agradeço aos meus orientadores, Isabele da Costa Angelo e Huarrisson Azevedo Santos, que conseguiram suportar toda minha intensidade e me ofereceram todo seu conhecimento, além do suporte acadêmico. Deus abençoe sempre a vocês. As portas de minha casa sempre estarão abertas para todos.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço aos produtores rurais e a todos que lutam pela pecuária, com trabalho diário, sempre lutando em busca de melhorias para suas produções, oferecendo a população uma segurança alimentar.

BIOGRAFIA

Olga Lucia Herrán Ramirez, nasceu em 14 de abril de 1984, na Colômbia. Filha de Olga Ramirez Triana e German Gustavo Herrán, tem duas irmãs, Angélica Maria Herrán Ramirez e Lorena Andrea Herrán Ramirez. É casada com seu companheiro de vida e grande amigo, Steven Muñoz Martino, e abençoada por Deus com um filho maravilhoso, o pequeno Miguel Angel.

Estudou no Colégio La Presentación, onde cursou o ensino fundamental e o ensino médio, concluído em 2000. No ano de 2001 ingressou na Universidade Tolima, no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. Durante a graduação obteve matrícula de honra e obteve a primeira posição em sua colação de grau. No ano de 2012 ingressou na Universidade CES, no curso de Pós-graduação em Saúde Pública, para cursar o mestrado.

Trabalhou na área de saúde animal, na pecuária de carne e leite, bem como na implementação de boas práticas agropecuárias, atuando como veterinária autorizada pelo Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) na certificação de fazendas livres de Bruceloses e Tuberculoses. Foi coordenadora do componente de sanidade animal no projeto intitulado “Assistência técnica e controle de gestão para o setor leiteiro de Antioquia” e coordenadora de rastreabilidade animal no projeto intitulado “Melhoria do sistema produtivo de rebanhos de leite e de carne de dupla finalidade por meio de Boas Práticas Pecuárias em fazendas piloto no departamento de Antioquia”. Tem experiência em docência nas disciplinas de epidemiologia, saúde pública e metodologia da pesquisa. Atuou como orientadora nos espaços de formação curricular para os estudantes de medicina veterinária na Universidade de Antioquia.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, no nível de Doutorado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2018, sob orientação da professora Isabele da Costa Angelo e coorientação do professor Huarrisson Azevedo Santos, amparada pelo Programa Bolsas Brasil - PAEC OEA/GCUB n°001/2007, no âmbito do Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (CGUB).

Durante o doutorado desenvolveu trabalhos de pesquisa juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho no Laboratório de Sanidade Avícola e multiuso (LASAVE). Após sua defesa de doutorado irá continuar trabalhando na área de saúde pública, apoiando as fazendas e os produtores com estudos epidemiológicos que contribuirão para a saúde animal e a segurança alimentar.

RESUMO GERAL

HERRÁN, Olga Lucia Ramírez. **Estudo soropidemiológico, molecular e espacial de espécies do gênero *Brucella* da região leiteira do Norte da Antioquia, Colômbia.** 2022. 146 p Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2022.

Na Colômbia, a brucelose bovina é uma doença endêmica, mas foi observado um aumento no número de bovinos soropositivos na região leiteira de Antioquia, considerada a principal área responsável pela produção de leite. O alarmante aumento do número de casos fez com que o Instituto Colombiano de Agricultura (ICA) declarasse quarentena na região desde 2018. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência sorológica e molecular de brucelose em bovinos na principal região leiteira da Colômbia, identificando a presença de anticorpos, do material genético do agente etiológico e dos fatores individuais e de rebanho associados à ocorrência da doença. Foi realizado um estudo epidemiológico do tipo transversal, a través de um questionário epidemiológico conduzido por entrevistadores treinados, com informações epidemiológicas para identificar fatores associados a presença de bruceloses bovina na região. Um total de 656 amostras de sangue total e soro sanguíneo foram obtidas de vacas ≥ 2 anos de idade, de 40 rebanhos, em quatro municípios do norte de Antioquia. O Teste Rosa de Bengala (RBT) foi usado como teste de triagem. Amostras RBT positivas foram confirmadas pelo Ensaio de Polarização de Fluorescência (FPA) e ELISA competitiva (cELISA) no Laboratório Nacional de Diagnóstico Veterinário do ICA. A detecção molecular foi realizada por ensaio de PCR em tempo real baseado em sonda, usando a amplificação do gene *bcs31*. As *Brucella*-DNA cepas de campo e as cepas vacinais, foram genotipadas mediante um ensaio baseado em marcadores SNP. O geoprocessamento QGIS foi usado para obter a georreferenciamento dos rebanhos positivos. Os fatores associados a presença de *Brucella*-DNA foram avaliados por meio de modelos de regressão logística. O ensaio qPCR detectou 9,5% (n=62/656; IC 95%: 7,3, 12,0) dos animais com presença de *Brucella*-DNA, enquanto o teste sorológico detectou 6,6% (n=43/656; IC: 4,8, 8,7). Foi observado que 62,5% (n=25/40; IC 95%: 45,8, 77,3) dos casos positivos foram detectados no rebanho pela qPCR, enquanto apenas 27,5% (n=11/40; IC 95%: 14,6, 43,9) foram detectados pelo teste sorológico. O teste Cohen's Kappa determinou uma fraca concordância entre os métodos sorológicos e moleculares. O ensaio qPCR, apresentou uma eficiência de 92,35%, e teve uma duração de 32 min. A acurácia diagnóstica da qPCR pela área sob a Curva Receptor-Operador (ROC) teve desempenho igual a 0,75 (IC 95%: 0,65, 0,84). Toda as amostras positivas pela qPCR foram genotipadas como cepas de campo empregando o ensaio SNP. Nos modelos de regressão logística, foi observado que as práticas associadas à reprodução, assim como a presença de espécies silvestres, e a proximidade dos rebanhos das estradas, oferecem condições favoráveis para o processo de disseminação da *Brucella* spp. A introdução de técnicas moleculares, a partir de amostras clínicas coletadas a campo, atuam como ferramentas para complementar o diagnóstico sorológico de bruceloses bovina, melhorando a acurácia dos resultados, e permitindo uma detecção precoce de *Brucella* spp. circulantes. As prevalências sorológicas e moleculares estiverem de acordo com a declaração de quarentena na região, sendo a prevalência molecular muito maior. Por fim, as técnicas moleculares permitem reconhecer fatores epidemiológicos associados à presença do agente etiológico no animal e não associados apenas à presença de anticorpos, possibilitando direcionar ações de prevenção e controle ajustadas ao nível local e detectadas a partir de fases de infecção de difícil diagnóstico, como aquelas iniciais ou crônicas.

Palavras-chave: Bruceloses, bovinos, PCR, epidemiologia molecular

ABSTRACT

HERRÁN, Olga Lucia Ramírez. **Seroepidemiological, a molecular and spatial study of species of the *Brucella* genus from the northern region of Antioquia, Colombia.** 2022. 146 p. Thesis (Ph.D. in the Post-Graduation Program in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

In Colombia, bovine brucellosis is an endemic disease, but an unusual increase in the number of seropositive cases in a leading dairy region, given raised an alarm and caused the Colombian Institute of Agriculture to quarantine for brucellosis in the Antioquia region in 2018. This epidemiological study was conducted to determine the seroprevalence and molecular prevalence of bovine brucellosis in the leading dairy region of Colombia that was declared quarantined for brucellosis, and to evaluate the factors associated with the presence of antibodies against *Brucella* spp, as well as the presence of *Brucella*-DNA at the animal and the herd level. A cross-sectional epidemiological study was carried out, using an epidemiological questionnaire, conducted by previously trained interviewers, with epidemiological information to identify factors associated with the presence of bovine brucellosis in the study region. A total of 656 serum and whole blood samples from ≥ 2 -year-old cows in 40 herds were used screened The Rose Bengal Test (RBT) was used as the screening test. Positives RBT samples were confirmed by the Fluorescence Polarization Assay (FPA) and c ELISA at the National Veterinary Diagnostic Laboratory of the Colombian Agricultural Institute (ICA). Molecular detection was performed by Probe-based Real-time PCR (Probe-qPCR) assay, using the bcs31 gene amplification. *Brucella*-DNA field strains and vaccine strains were genotyped employing SNP. The geoprocessing tool QGIS was used to obtain the georeferencing of positive herds. Factors associated with the presence of *Brucella*-DNA were evaluated using logistic regression models. The qPCR assay detected 9.5% (n=62/656; 95% CI: 7.3, 12.0) of the animals with *Brucella*-DNA presence, while the serological test detected a 6.6% (n=43/656; CI: 4.8, 8.7). 62.5% (n=25/40; 95% CI: 45.8, 77.3) of positive cases were detected at the herd-level by the qPCR, while only 27.5% (n=11/40; 95% CI: 14.6, 43.9) were detected by the serological test. The Cohen's Kappa test determined a weak agreement between methods. The qPCR assay was accomplished in 32 min and had an efficiency of 92.35%. The diagnostic accuracy of the qPCR by the area under the Receiver-Operator Curve (ROC), had performance equal to 0.75 (95% CI: 0.65, 0.84). All positive herds by serology tests were also positive by the qPCR. However, not all positive herds by the qPCR were positive on the serology test. All positive samples were identified as field *Brucella abortus* strains employing the SNP-based assay. In logistic regression models, it was observed that management practices, mainly associated with reproduction, presence of wild species and the proximity of herds to the roads, offer favorable conditions for the process of dissemination of *Brucella* spp. among animals and in herds. This research concluded that the introduction of molecular techniques from clinical samples collected in the field act as tools to complement the diagnosis of bovine brucellosis. Molecular techniques also provide an improvement in the confidence of the results, when compared with serological techniques, and allow for early detection of *Brucella* spp. circulating in the animal. The serological and molecular prevalence were in accordance with the declaration of quarantine in the region, with the molecular prevalence being much higher. Lastly, molecular techniques allow the researcher to recognize epidemiological factors associated with the presence of the etiological agent in the animal and not associated only with the presence of antibodies, making it possible to direct prevention and control actions adjusted at the local level and detected from difficult-to-diagnose infection phases, such as initial or chronic ones.

Keywords: Brucellosis, cattle, PCR, molecular epidemiology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fazendas e animais soropositivos nos municípios do estudo. Instituto Colombiano Agropecuário. Boletim epidemiológico 2016.	50
Tabela 2. Faixa etária de bovinos de fazendas provenientes do município de Antioquia relacionada com a campanha de vacinação contra febre aftosa e brucelose no segundo semestre de 2017.	57
Tabela 3. Soroprevalência de brucelose em relação aos animais no 2019, estimativas para cada município do norte de Antioquia, Colômbia, usando 95% de confiança.	64
Tabela 4. Soroprevalência de brucelose em relação aos rebanhos no 2019, estimativas para cada município do norte de Antioquia, Colômbia, usando 95% de confiança.	65
Tabela 5. Distribuições de frequência e análise bivariada de respostas dicotômicas as perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.	67
Tabela 6. Distribuições de frequência e análise bivariada de respostas politômicas a perguntas de pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.	69
Tabela 7. Modelo multivariado com potenciais fatores de risco ao nível do animal e do rebanho para soropositividade <i>Brucella</i> spp. em gado leiteiro de Antioquia, Colômbia.	71
Tabela 8. Análise de concordância utilizando a estatística de Kappa de Cohen entre qPCR e testes sorológicos seriados (RBT e cELISA).	91
Tabela 9. Distribuições das frequências e análise bivariada de respostas dicotômicas a das perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.	93
Tabela 10. Distribuições da frequência e análise bivariada de respostas politômicas a perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.	95
Tabela 11. Modelo multivariado com potenciais fatores de risco em relação aos animais e ao rebanho para soropositividade de <i>Brucella</i> spp. em gado leiteiro de Antioquia, Colômbia.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação diagramática do envelope celular de <i>Brucella</i> spp. Fonte: HAANG et al. (2010).....	14
Figura 2. Representação diagramática da interação <i>Brucella</i> -macrófago. Fonte: HAANG et al. (2010).....	16
Figura 3. (A) Micrografias eletrônicas de <i>Brucella</i> spp. Flagelado isolado de rãs-touro africanas. (B, C) Algumas bactérias com flagelos polares. Fonte: AL DAHOUK et al. (2017)	21
Figura 4. Produtor assinando voluntariamente o acordo de consentimento informado para participar. Fazenda a Primavera, San Pedro de los Milagros, Antioquia.	59
Figura 5. (A) Materiais para coleta de amostra nas fazendas. (B) Animais em curral de manejo antes da coleta de amostras fazenda Encenillo, San Pedro de los Milagros.....	60
Figura 6. Distribuição espacial da presença de anticorpos de <i>Brucella</i> spp. nos rebanhos, proximidade das principais estradas e número de vacas positivas por sorologia na região leiteira de Antioquia, Colômbia.....	65
Figura 7. Avaliação ótima da concentração e a pureza da extração do DNA a partir de sangue total com espectrofotômetro Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, EUA).	90
Figura 8. Avaliação da integridade do DNA em gel de agarose 0,8%.....	90
Figura 9. Curva padrão sem DNA, à direita e com DNA bovino, à esquerda.	91
Figura 10. Diagrama de Venn mostrando a concordância entre os testes sorológicos seriados (RBT, FPA e cELISA) e os resultados do bcsp31 qPCR (amostras de sangue de bovino/rebanho).....	92
Figura 11. Gráfico da curva ROC da taxa de verdadeiros positivos versus a taxa de falsos positivos para todos os valores de corte possíveis.....	92
Figura 12. Distribuição espacial da presença de <i>Brucella</i> -DNA nos rebanhos próximos das principais estradas e número de vacas positivas por qPCR na região leiteira de Antioquia, Colômbia.	93

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

APHIS	Serviço de Inspeção de Sanidade Animal e Vegetal USA
AUC	<i>Area under an ROC curve</i> (rea baixo Receptor-Operador)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e prevenao de Doenças)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoadsorção enzimática)
CEP	Comit de tica na Pesquisa
CEUA	Comit de tica no Uso de Animais
Cq	Ciclo de quantificação
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (cido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (cido etileno-amino-tetracético)
IA	Inseminaco artificial;
IC	Intervalo de Confiança;
ICA	Instituto Colombiano de Agricultura
FPA	Ensaio de fluorescência polarizada
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i> (Razão de chances)
AOR	<i>Adjusted Odds Ratio</i> (Razão de chances ajustada)
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação da cadeia polimerase)
pb	Pares de base
p-valor	Nível significância
RBT	Rosa de Bengala <i>Test</i>
ROC	Curva Receptor-Operador
R²	Coefficiente de determinação
S-LPS	Lipopolissacarídeo liso
µL	Microlitro
°C	Grados centigrados

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1.REVISAO DE LITERATURA	5
1.1 História.....	5
1.2Taxonomia e morfologia	6
1.2.1 Evolução de <i>Brucella spp.</i>	9
1.2.2 <i>Brucella spp. Genômica</i>	11
1.3. Estrutura, Biossíntese, Genética e Fatores de Virulência.....	11
1.3.1. Sistemas de secreção de <i>Brucella spp.</i>	12
1.3.3. LPS Dissociação de suave (S) a áspera (R).....	17
1.3.4. <i>Lipoproteínas</i>	18
1.3.5.Sistema de dois componentes BvrR/BvrS.....	19
1.3.6.Pseudogenes, deleção de gene ou aquisição de gene	19
1.3.7. <i>Flagelo</i>	20
1.3.8.Transferência horizontal de genes.....	21
1.4.Patogêneses: <i>Brucella spp.</i> são parasitos de grande sucesso.....	22
1.5.Epidemiologiada Brucelose em animais	25
1.5.1. <i>Distribuição geográfica da doença</i>	25
1.5.2. <i>Sinais clínicos</i>	27
1.5.3. <i>Transmissão</i>	29
1.5.4. <i>Sobrevivência</i>	30
1.6. Infecção na fêmea e progênie.....	31
1.7. Papel do macho	33
1.8.Hospedeiros Erráticos ou Reservatórios?.....	33
1.9. Medidas de prevenção na pecuária.....	35
1.10.Vacinação para brucelose bovina.....	35
1.10.1. <i>Cepa vacinal B19</i>	36
1.10.2. <i>Cepa vacinal RB51</i>	37
1.10.3. <i>Reversão para virulência</i>	38
1.11. <i>Brucella spp.</i> como agente bioterrorista.....	38

1.12.Epidemiologia da Bruceloses em Humanos	39
1.13.Diagnóstico de Bruceloses na pecuária	42
1.13.1. Métodos indiretos: testes sorológicos	42
1.13.1.1. Teste Rosa de Bengala (RBT).....	44
1.13.1.2. Elisa indireta	45
1.13.1.3. Ensaio de polarização de fluorescência.....	46
1.13.1.4. Elisa Competitiva	46
1.13.2.Métodos Direitos: Cultura	47
1.13.3.Métodos Direitos: PCR	47
1.14.Situação atual e programa oficial de prevenção e controle da brucelose bovina na Colômbia	49
CAPÍTULO I	51
RESUMO	52
ABSTRACT	53
1INTRODUÇÃO.....	54
2.MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1Tipo de estudo epidemiológico	57
2.2Características demográficas da População	57
2.3. População	58
2.3.1. População origem do estudo.....	58
2.3.2. População alvo.....	58
2.4.Critérios de inclusão e exclusão	58
2.4.1. Unidades primarias de amostragem (bovinos)	58
2.4.2. Unidades secundarias de amostragem (fazendas)	58
2.5.Delineamento amostral.....	58
2.6.Questionário Epidemiológico.....	59
2.7.Coleta de Amostra.....	60
2.8.Teste sorológico	61
2.8.1. Teste rosa bengala	61
2.8.2. Teste Fluorescência polarizada	61
2.8.3. Elisa competitiva	61

2.9. Controle de erros e viés.....	62
2.11. Análise estatística.....	62
2.12. Declaração de ética.....	63
3. RESULTADOS	64
4. DISCUSÃO	72
5. CONCLUSÃO.....	77
CAPÍTULO II.....	78
RESUMO	79
ABSTRACT.....	80
1. INTRODUÇÃO	81
2. MATERIALE MÉTODOS.....	83
2.1. Estudo epidemiológico	83
2.2. Amostragem e população-alvo	83
2.3. Coleta de dados epidemiológicos	83
2.4. Extração de DNA genômico de amostras.....	83
2.5. Análise de qualidade.....	84
2.6. Eficiência, precisão e sensibilidade analítica da qPCR.....	85
2.7. Detecção molecular de <i>Brucella</i> spp.	85
2.8. Diferenciação de cepas de campo de <i>Brucella</i> spp. da cepa vacinal RB51.....	87
2.9. Sequenciamento.....	88
2.10. Definição de caso.....	88
2.11. Análise espacial	88
2.12. Análise estatística	88
2.13. Declaração de ética.....	89
3. RESULTADOS	90
4. DISCUSSÃO.....	97
5. CONCLUSÃO.....	102
CONCLUSÃO GERAL	103
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

INTRODUÇÃO GERAL

A brucelose é uma doença infecciosa grave, de caráter zoonótico, considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um problema de saúde público negligenciado. O plano global de combate as doenças infecciosas e emergentes (2008-2015) sinalizaram uma deficiência nos métodos de diagnósticos desta patologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Além disso, apesar da brucelose apresentar um perfil endêmico nas Américas, está gerando preocupação para os países que apresentaram novos casos, mesmo após a erradicação. No plano de ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e ações pós-eliminação (DIN) (2016-2022), foi sinalizado que a situação epidemiológica regional da brucelose, ainda necessita ser avaliada e documentada nas Américas, para avançar dentro dos programas de controle da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A brucelose é causada por bactérias Gram-negativas do gênero *Brucella*, que atualmente é constituído por doze espécies (EL-SAYED & AWAD, 2018), sendo que oito delas apresentam potencial zoonótico. As espécies *Brucella. melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* são consideradas as mais patogênicas para o homem e, portanto, estão incluídas no Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e devem ser notificados de forma obrigatória. A transmissão da bactéria para as pessoas está relacionada com o consumo de produtos lácteos não pasteurizadas, carnes mal passada e ao risco laboral, que está relacionado com os trabalhadores da pecuária, de laboratórios e abatedouros (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

B. abortus é apontada como responsável por mais de 80% dos casos de brucelose, sendo os bovinos os hospedeiros primários do agente etiológico, podendo acometer outras espécies de animais, dificultando ainda mais o controle da doença. A brucelose afeta significativamente a produção pecuária, gerando sérios impactos na subsistência dos agricultores em todo o mundo, principalmente nos países latino-americanos.

Na América Latina, *B. abortus* tem maior prevalência em animais da pecuária leiteira, com valores que variam entre 0,1% e 20,3% (FONDO NACIONAL DEL GANADO, 2012), estimando perdas anuais de aproximadamente US\$ 600 milhões relacionadas a doença em bovinos (ACHA & SZYFRES, 2005). Nesses países latino americanos, a prevalência tem uma ampla variação, mostrando-se alta (> 10%) no Peru e México, intermediária na Argentina, Venezuela, Chile, Brasil (4-5%) e Colômbia (3,5%) (LUCERO et al., 2008;

SAMARTINO & EDDI, 2010). O Uruguai conseguiu promover o controle da brucelose, chegando a apresentar uma prevalência inferior a 0,5% (SAMARTINO & EDDI, 2010).

O padrão ouro para o diagnóstico e tipificação da brucelose é o cultivo e isolamento das bactérias do gênero *Brucella*, de materiais contendo uma grande quantidade de microrganismos como tecidos de recém-nascidos e fetos abortados. No entanto, isolar esta bactéria requer tempo, recursos, instalações de biossegurança de nível 3 e uma equipe técnica altamente treinada para trabalhar com este agente etiológico, que pertence ao grupo de bactérias de risco III (RICHARDSON et al., 2009). Em situações que o exame bacteriológico não pode ser executado, utiliza-se os exames diagnósticos imunológicos e/ou moleculares (OIE, 2018). Embora os métodos sorológicos sejam mais comumente usados para a vigilância e o controle oficial da brucelose bovina, faz-se necessário uma melhor compreensão destas ferramentas diagnósticas e do comportamento do sistema imunológico dos animais infectados, para um melhor entendimento dos resultados.

A busca persistente por melhores testes diagnósticos enfatiza a inexistência do teste perfeito (fácil, robusto, acessível, capaz de identificar todos os indivíduos infectados, diferenciando animais vacinados ou que apresentam anticorpos produzidos por reação cruzada com outras bactérias). Os resultados dos testes diagnósticos da brucelose podem ser afetados por falhas técnicas, fatores biológicos, epidemiológicos e socioeconômicos complexos. Estes fatores incluem: (1) a ausência de sinais clínicos patognomônicos, (2) o comportamento silencioso do patógeno em relação ao sistema imunológico, (3) seu alvo intracelular, (4) uma estrutura antigênica complexa compartilhada por cepas de campo e de vacinas, (5) comportamentos infecciosos diferentes nos hospedeiros animais, (6) requerimentos de biossegurança para diagnóstico e (7) o uso de alguns testes para controle e erradicação em relação àqueles utilizados para vigilância.

Existe uma ampla faixa de sensibilidade e baixa especificidade nos testes sorológicos, principalmente em áreas de alta endemicidade, com vacinação massiva de animais. As reações positivas devem ser avaliadas com a utilização de estratégias confirmatórias ou complementares adequadas, incluindo uma investigação da situação epidemiológica. As falsas reações sorológicas positivas (FRSP) podem ocorrer por bactérias que possuem uma cadeia “O”, semelhante à da *Brucella* spp., sendo a bactéria da espécie *Yersinia enterocolitica* (cadeia O: 9) a principal causadora de reações cruzadas no diagnóstico sorológico da brucelose, pois apresenta uma cadeia “O” de lipopolissacarídeos liso (S-LPS), que é quase idêntica à da *B. abortus* (TROTTA et al., 2020; WEYNANTS et al., 1997). É fundamental,

em casos suspeitos ou com fortes correlações epidemiológicas previamente estabelecidas, mesmo em casos de reações negativas, que sejam utilizados métodos diagnósticos com maior acurácia diagnóstica.

A identificação de *Brucella* spp., baseada nas técnicas de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foi desenvolvida inicialmente para a determinação de isolados bacterianos a partir de amostras consideradas materiais de eleição para a detecção deste patógeno, como tecidos de recém-nascidos, fetos abortados e nódulos linfáticos regionais. As amostras clínicas, como sangue total, têm sido pouco consideradas e, embora sejam facilmente obtidas a partir de animais vivos, necessitam de técnicas moleculares com alta sensibilidade para detectar uma baixa quantidade de bactérias nestas amostras (MORATA et al., 1998). Para se obter resultados satisfatórios com as técnicas de moleculares, é fundamental a utilização de protocolos eficientes e adequados nas etapas de extração de DNA e de PCR, sempre selecionando os métodos moleculares de maior acurácia, que combinam sensibilidade, especificidade, segurança e velocidade de detecção. Atualmente, ainda não existem estudos suficientemente validados que demonstraram uma reprodutibilidade -laboratorial adequada, mas, enquanto isso, o isolamento e cultivo bacteriano, associados aos métodos sorológicos permanecem sendo as principais ferramentas para o diagnóstico de brucelose.

A brucelose bovina é endêmica na Colômbia e, a partir do ano 2002, foi iniciado um programa de prevenção e controle da doença que promove medidas para o aumento de rebanhos bovinos livres da doença, com a obrigatoriedade da vacinação de bezerras, associada ao controle da mobilização destes animais. No entanto, apesar de terem sido estabelecidas 13 modificações nas normativas do programa, quase não foram observados avanços importantes para o controle da doença. Na Antioquia, região que impulsiona a produção de leite na Colômbia, é considerada um exemplo de competitividade produtiva, boas práticas pecuárias (BPG) e cumprimento dos programas oficiais do controle da doença. Porém, nos últimos anos, ocorreu um aumento incomum no número de animais soropositivos e, diante disto, em agosto de 2018, o Instituto Colombiano Agropecuário (ICA) declarou quarentena para a brucelose bovina e publicou medidas sanitárias especiais nesta região.

A situação epidemiológica da brucelose aparentemente tem mudado ao longo do tempo e as estratégias de controle em países endêmicos estão demonstrando resultados variáveis. A doença apresenta sérios desafios econômicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos para criadores, veterinários, médicos e autoridades de saúde pública. Seu impacto socioeconômico, necessita de abordagens relacionadas a saúde única e a variedade de

hospedeiros envolvidos, incluindo os da vida selvagem, tornam a brucelose uma doença mais complexa. Essa complexidade é aumentada pelo fato de que, embora algumas espécies de *Brucella* tenham um hospedeiro preferencial, as barreiras não são tão rígidas e, além disso, as infecções cruzadas podem ser significativas em sistemas de manejo misto, ou na interface da vida doméstico-selvagem, dificultando o controle e a erradicação.

Estudos epidemiológicos da brucelose na região da Antioquia são necessários pois os dados relacionados a esta região estão desatualizados, sendo fundamental identificação da prevalência atual da doença na região, bem como a identificação dos fatores associados em casos de surto. Para que haja uma implementação efetiva de programas de controle da brucelose em países endêmicos, primeiramente deve-se caracterizar seus fatores associados à transmissão e permanência de *Brucella* spp. nos animais e nos rebanhos. O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina da região leiteira do norte da Antioquia, Colômbia. Os objetivos específicos foram: estimar a prevalência de brucelose em bovinos com a utilização de métodos sorológicos convencionais; estimar a prevalência de brucelose em bovinos por testes moleculares que identificam a presença do material genético de *Brucella* spp.; bem como estabelecer a identidade das espécies de *Brucella* spp. circulantes, contribuindo para atualizar a prevalência da bactéria na região, e fim de determinar os fatores de risco individuais e de rebanho associados à ocorrência da infecção para um desenvolvimento de medidas de prevenção e controle mais efetivos contra a doença.

1. REVISAO DE LITERATURA

1.1 História

Embora, até meados do século XIX, a brucelose não tivesse sido caracterizada ou seu agente causador identificado, esta patologia já havia sido denominada como uma doença debilitante na antiguidade. O primeiro caso publicado foi relatado por D'Anastasio et al. (2011), que diagnosticaram a brucelose vertebral do final do período Plioceno, em um esqueleto parcial de *Australopithecus africanus*, demonstrando que essa doença infecciosa ocasionalmente afetou nossos ancestrais diretos a 2,3-2,5 milhões de anos atrás (D'ANASTASIO et al., 2011).

Durante os séculos XVII e XVIII, houve numerosos relatos de febres ondulantes no Mediterrâneo e a maioria receberam os nomes dos locais onde ocorreram (febre do Mediterrâneo, febre da rocha de Gibraltar, febre de Chipre, febre do Danúbio). A Brucelose despertou interesse especial até o século XIX, quando afetou maciçamente os soldados britânicos que estavam localizados na ilha de Malta. Acredita-se que Malta se tornou um centro importante para o estudo da febre ondulante, porque muitas tropas britânicas foram enviadas para lá para se recuperar após a Guerra da Crimeia (1853-1856), onde médicos habilidosos utilizavam termômetros para monitorar a progressão da doença. Em 1863, Dr. Jeffrey Allen Marston, cirurgião designado para trabalhar na ilha, fez a primeira descrição detalhada da brucelose de seus próprios sintomas, diferenciando-a da febre tifoide (MARSTON, 1863; PÉREZ SANCHO, 2014).

O microrganismo responsável pela febre de Malta foi descoberto por um médico do exército britânico, Sir David Bruce, em 9 de julho de 1887, e o chamou de *Micrococcus melitensis* (*Brucella melitensis*) (de Melita \approx mel, típico produto de Malta) (NICOLETTI, 2002). Este patógeno foi isolado do baço de um soldado britânico que morreu da doença. Em 1905 Temístocles Zammit demonstrou o caráter zoonótico da brucelose por meio do consumo de leite de cabra cru e estabeleceu que as cabras eram os principais reservatórios da infecção, podendo o patógeno ser identificado no sangue, na urina e no leite. Essa descoberta ajudou a explicar a epidemiologia da doença. A partir daquele momento, o consumo de leite de cabra foi proibido entre as tropas inglesas em Malta, resolvendo efetivamente o problema de saúde pública nas forças armadas britânicas (NICOLETTI, 2002). Em períodos próximos, um médico e veterinário dinamarquês, Bernhard Bang, descobriu a bactéria da espécie *Bacterium abortus* (*Brucella abortus*), em 1897, enquanto investigava o aborto contagioso que vinha afetando o gado na Dinamarca por mais de um século. Ele também descobriu que o

organismo afetava cavalos, ovelhas e cabras, ficando conhecido como causador da “doença de Bang”. O caráter zoonótico desta patologia foi descoberto por Alice Evans, uma bacteriologista americana, na década de 1920. A morfologia e a patologia dos organismos *Bacterium abortus* e *Micrococcus melitensis* eram muito semelhantes. As descobertas das espécies do gênero continuaram: em 1914, Jacob Traum (EUA) isolou *Brucella suis* em porcos; em 1956, Malcom Buddle (Nova Zelândia) isolou *Brucella ovis* de ovelhas; em 1957, H. G. Stoener (EUA), isolou *Brucella neotomae* de ratos do deserto de Utah; em 1968, Leland Carmichael (EUA), isolou *Brucella canis* de cães. O nome de Sir David Bruce foi continuado na nomenclatura dos organismos até hoje (LOPARDO et al., 2017).

1.2 Taxonomia e morfologia

Os membros da classe Alphaproteobacteria, ordem Rhizobiales, incluem famílias de organismos que são patógenos de mamíferos, de plantas ou simbioses. A família *Brucellaceae* é uma família de bactérias Gram negativas, atualmente composta por sete gêneros; *Brucella*, *Daeguia*, *Falsoleptanthera*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum* e *Pseudochrobactrum* (ASHFORD et al., 2020; LECLERCQ et al., 2019). A espécie *Ochrobactrum intermedium* se encontra intimamente relacionada filogeneticamente com o gênero *Brucella* (VELASCO et al., 1998) o que a torna responsável pelos erros de identificação de algumas espécies de *Brucella* (ROMERO et al., 1995).

As características da *Brucella*, que a distinguem da maioria dos gêneros dentro da ordem Rhizobiales, incluem um genoma simplificado, em relação aos patógenos de plantas. O genoma de *Brucella* spp. é 50-100% maior do que da *Bartonella* spp., preservando mais funções metabólicas compartilhadas pelos fitopatógenos. A identificação de *Brucella microti* no solo e sua persistência por até dez semanas é condizente com a capacidade de utilizar metabolicamente moléculas baseadas em plantas., e aponta para um nicho ambiental compartilhado por grande parte dos gêneros desta família (FICHT, 2010).

As bactérias do gênero *Brucella* são microrganismos do tipo cocobacilos Gram negativos, pequenos, aeróbios estritos, com dimensões de $0,5-0,7 \times 0,6-1,5 \mu\text{m}$, podendo ser organizados individualmente, em pares, em cadeias curtas ou pequenos grupos, dependendo das condições de crescimento. Em geral, a morfologia de cepas de *Brucella* spp. é constante, sendo as formas pleomórficas raras, exceto em culturas antigas, que cresceram em condições adversas (MORENO, 2020). A presença de plasmídeos e flagelos apresentam divergências (Fretin et al., 2005; Letesson et al., 2002) e, além disso, estas bactérias não possuem cápsulas, nem formam esporos, sendo a maioria espécies de crescimento lento. Por muito tempo, foi

considerado um patógeno intracelular facultativo, mas recentemente foram designados como extracelulares e intracelulares facultativos (KÖHLER et al., 2002; LAMONTAGNE et al., 2009), devido ao tamanho maior do genoma, que permite que *Brucella* spp. apresente e possa compartilhar mais funções metabólicas com seus patógenos de plantas relacionados, assim como a capacidade de persistir no solo ou em outros ambientes por longo período, facilitando a capacidade de utilização de moléculas de plantas (EL-SAYED & AWAD, 2018; KÖHLER et al., 2003).

Meyer e Shaw determinaram o gênero *Brucella* em 1920 com duas espécies: *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* (LÓPEZ-GOÑI & MORIYÓN, 2004). Cem anos depois, a classificação já inclui doze espécies de dentro do gênero, categorizadas como clássicas ou atípicas (SCHOLZ et al., 2016; SOLER-LLORÉNS et al., 2016). A taxonomia tradicional do gênero *Brucella* (um gênero dividido em várias espécies, algumas com diferentes biovars) pode ser dividida com base na patogenicidade, nas características fenotípicas (susceptibilidade a fagos, soroaglutinação, crescimento em presença de vários corantes, entre outros), variações antigênicas, mas principalmente na preferência natural do hospedeiro acometido (FICHT, 2010; SCHOLZ et al., 2018), razão pela qual o nome das espécies da bactéria do gênero foram designados de acordo com o anfitrião preferido. Entretanto, atualmente são consideradas espécies associadas, mas não obrigadas a hospedeiros específicos (Waldrop and Sriranganathan, 2019). As 6 espécies clássicas mencionados em ordem de importância zoonótica são: *B. melitensis* [(biovars 1–3) (ovelhas e cabras)], *B. abortus* [(biovars 1–7 e 9) (bovinos)], *B. suis* [(biovars 1–5) (biovar 1 e 3 em porcos; biovar 2 em lebres e porcos, biovar 4 em renas e caribus e biovar 5 em roedores) (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2018)], *B. canis* (cães) (CARMICHAEL & BRUNER, 1968), *B. neotomae* (ratos do deserto) (STOENNER & LACKMAN, 1957), e a última espécie clássica *B. ovis* (ovelhas) (BUDDLE, 1956) que não apresenta importância zoonótica (CLOECKAERT et al., 2002a).

O gênero *Brucella* se encontra em expansão, com novas descobertas científicas em relação a sua estrutura, seu metabolismo e suas características genéticas, podendo estabelecer seis espécies atípicas, relacionadas ao seu rápido crescimento (SCHOLZ et al., 2018), pelas características de motilidade fenotípica expressas (AL DAHOUK et al., 2017; EISENBERG et al., 2012), por terem longa persistência em reservatórios ambientais (SCHOLZ et al., 2008a), por sua expansão para mamíferos marinhos, bem como alguns anfíbios (EISENBERG et al., 2012; EWALT et al., 1994; FISCHER et al., 2012; JAÝ et al., 2018; ROSS et al., 1994;

SOLER-LLORENS et al., 2016), sendo que algumas destas espécies poderiam apresentar potencial zoonótico (ROVID SPICKLER, 2007; TILLER et al., 2010b).

As espécies denominadas atípicas descobertas em 1994, correspondem aos isolados de animais marinhos: *Brucella pinnipedialis* em focas e *Brucella ceti* em baleias e golfinhos (EWALT et al., 1994; FOSTER et al., 1996). Cabe lembrar que, antes dessa data, não se tinham relatos de *Brucella* infectando mamíferos marinhos, somente mamíferos terrestres (EWALT et al., 1994). Atualmente, o potencial zoonótico das espécies marinhas é reconhecido, bem como sua correlação com formas graves da doença em humanos, como a neurobrucelose (SOHN et al., 2003).

Em 2007 a espécie *Brucella microti* foi descrita, em roedores silvestres (*Microtus arvalis*) (HUBÁLEK et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008b) e, posteriormente, foi isolada de raposas vermelhas (SCHOLZ et al., 2009) e diretamente do solo (SCHOLZ et al., 2008a). Em 2008, uma cepa inusual de *Brucella*, designada BO1, foi isolada do implante de mama de uma mulher americana de 71 anos com sintomas de bruceloses (DE et al., 2008). Esta cepa foi diferenciada molecularmente das outras espécies e denominada como *Brucella. inopinata* (única espécie que ainda se desconhece seu hospedeiro natural) (SCHOLZ et al., 2010). Nesse mesmo ano foi identificada a cepa de *Brucella* BO2, em um paciente australiano com doença pulmonar crônica, que possuía uma grande similitude com *B. inopinata*. A biopsia do paciente foi realizada no ano 2007, sendo erroneamente identificada como *Ochrobactrum anthropi*, pelo sistema API 20NE (TILLER et al., 2010b, 2010a). Estudos demonstraram que a cepa BO2 era claramente distinta da BO1 (EISENBERG et al., 2012).

O posicionamento das espécies atípicas de *Brucella* detectadas (*B. microti* e *B. inopinata*) foi problemático devido à clara distinção destas espécies em relação as clássicas, em níveis fenotípicos e genéticos. Ambas são de crescimento rápido e altamente ativas metabolicamente (EL-SAYED & AWAD, 2018). Em 2009 foi identificada a espécie *Brucella papionis*, isolada a partir de crias de primatas não humanos (babuínos) (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009; WHATMORE et al., 2014). No ano 2016 se isolou *Brucella vulpis*, nos nódulos linfáticos mandibulares de raposas vermelhas na Áustria (SCHOLZ et al., 2016). Em 2012, foram isoladas espécies de *Brucella* em hospedeiros não mamíferos, que, pelas análises filogenéticos, podem pertencer a espécie *B. inopinata*, identificadas em rã-touro-africana (*Pyxicephalus adspersus*) e da rã-de-olhos-grandes da África (*Leptopelis vermiculatus*) (KIMURA et al., 2017). Kimura et al. também demonstraram que as cepas BO1 e BO2 de *B. inopinata*, isoladas de pacientes humanos, são geneticamente relacionadas às

espécies de *Brucella* identificadas na África, e propõe que várias rãs de diferentes países são os hospedeiros naturais ou suscetível de um novo clado de bactéria *Brucella*, incluindo *B. inopinata* (KIMURA et al., 2017). As novas espécies de *Brucella*, recentemente isolada em rãs gigantes africanas, em contraste com toda as espécies descritas, são móveis e equipadas com um único flagelo lateralmente anexado. O sequenciamento do genoma confirmou que esta espécie pertencesse ao gênero *Brucella* (HAMMERL et al., 2017; KÖHLER et al., 2003).

Nas Américas, o primeiro caso de infecção por *Brucella* descrito em um anfíbio foi na rã Pac-Man (*Ceratophyrus ornate*), reportado num hospital veterinário no Texas (SOLER-LLORÉNS et al., 2016). A cepa B13-0095 isolada pertence a um grupo de espécies de *Brucella* divergentes iniciais, que inclui *B. inopinata*, cepa BO1 e cepa BO2 (clado BO), com características que se desviam significativamente daquelas de *Brucella* spp. A análise de sequência do genoma B13-0095 revelou várias características específicas que sugerem que este isolado representa um intermediário entre um ancestral associado ao solo e a espécie “clássica”, adaptada ao hospedeiro. As cepas BO2 e B13-0095 não possuem os genes necessários para produzir o O-PS, à base de perosamina encontrado na *Brucella* clássica, mas tem um conjunto de genes que poderiam codificar um O-PS atípica à base de ramnose. A B13-0095 tem uma taxa de replicação intracelular muito rápida em células epiteliais e macrófagos (SOLER-LLORÉNS et al., 2016).

1.2.1 Evolução de *Brucella* spp.

A análise das sequências do genoma de *Brucella* spp. começou descrever o caminho evolutivo de um organismo ambiental a um patógeno furtivo. Isso envolveu a aquisição de material genético que codifica os fatores de virulência combinados com a redução do genoma, para se adaptar ao ciclo de vida do parasito (SOLER-LLORÉNS et al., 2016; WATTAM et al., 2014). Também acredita-se que as espécies de *Brucella* tenham evoluído independentemente da evolução de seus hospedeiros, uma vez que a filogenia de *Brucella* spp. não parece refletir na filogenia dos hospedeiros de predileção das espécies (LAMONTAGNE et al., 2009).

A capacidade de invadir hospedeiros mamíferos é uma característica que pode ter sido adquirida pela *Brucella* spp. Existem vários componentes que podem desempenhar esse papel, incluindo genes que codificam a biossíntese de polissacarídeos, sistemas de secreção, adesinas e invasinas. No entanto, também é possível que os genes envolvidos na captação ou invasão de células de mamíferos estivessem presentes em organismos progenitores e em patógenos de plantas (EL-SAYED and AWAD, 2018). Durante esse processo, muitos genes perderam sua

função e tornam-se excluídos ou pseudogenizados. Avaliação dos genomas de várias *Brucella* spp. indica uma perda da função dos genes via formação de pseudogene, durante a adaptação ao estilo de vida intracelular (EL-SAYED & AWAD, 2018; TSOLIS et al., 2009) e, mais recentemente, a transferência horizontal de genes associada a importantes determinantes de virulência, parece também estar associada à adaptação ao estilo de vida intracelular (SOLLERLORÉNS et al., 2016; WATTAM et al., 2014).

Foster et al., 2009, avaliaram as relações taxonômicas e evolutivas de cinco espécies de *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* e *B. ovis*, usando comparações de genoma completo e revelaram que a linhagem de *B. ovis* é basal em relação ao restante da linhagem. A maioria das espécies de *Brucella* divergiu de seu ancestral comum, a espécie *B. ovis*, nos últimos 86.000 a 296.000 anos (FOSTER et al., 2009). A razão pela qual o *B. ovis* não apresenta caráter zoonótico está relacionada a uma alta porcentagem de pseudogenes e outros elementos genéticos móveis em comparação com o restante das espécies de *Brucella*, devido à degradação do genoma (TSOLIS et al., 2009). Essa degradação e reorganização genômica levam à exclusão da ilha genômica 2, causando ausência de funções de codificação responsável pela biossíntese de lipopolissacarídeos, inativação de genes responsáveis pela síntese das proteínas da membrana externa, além da inativação de genes essenciais que regulam a captação e utilização de nutrientes, como aqueles genes que codificam Urease. Estes processos levam à perda da capacidade de *B. ovis* invadir seres humanos e muitas outras espécies de mamíferos (EL-SAYED & AWAD, 2018; TSOLIS et al., 2009).

Estabelecer relações dentro do gênero *Brucella* tem sido desafiador por causa dos poucos polimorfismos genéticos que distinguem cada espécie. De fato, o gênero *Brucella* possui alta similaridade entre os genomas das suas espécies, seu conteúdo genético e organização genética são quase idênticos, exibindo 16S rRNA e sequências de genes *recA* bastante similares (SCHOLZ et al., 2008a), bem como genomas altamente semelhantes em termos de identidade de sequência e síntese de genes (TSOLIS et al., 2009; VERGER et al., 1985). Assim mesmo, na maioria dos genes de manutenção “*housekeeping*” apenas polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) estão presentes entre as espécies de *Brucella* (WHATMORE, 2009).

Devido à alta homologia genômica entre as espécies clássicas de *Brucella* spp., na década de 1980, a classificação destas espécies foi questionada em relação a critérios moleculares. Verger et al., determinaram a existência de um alto grau de homologia (maior que 90%) entre as diferentes espécies do gênero por ensaios de hibridização de DNA-DNA,

um fato observado por Hoyer *et al.* vinte anos antes (HOYER & MCCULLOUGH, 1968). Portanto, em 1988, o Subcomitê da Taxonomia do gênero *Brucella* estabeleceu que este o gênero bacteriano fora formado apenas por uma espécie (*B. melitensis*), assim o resto das espécies descritas até o momento se tornaram 18 biovars de *B. melitensis* (CORBEL & BRINLEY, 1982; VERGER *et al.*, 1985). Apesar desta modificação no contexto taxonômico, foi recomendado manter a classificação tradicional para evitar confusão, já que esta nova nomenclatura poderia representar um certo risco em termos de biossegurança para pesquisadores não familiarizados com o gênero *Brucella*. que não saberiam as diferenças de patogenicidade dos diferentes membros (FICHT, 2010). A reconsideração como critério de classificação de certas propriedades biológicas, como a preferência do hospedeiro, abriu o debate novamente e, em 2003, o Subcomitê de Taxonomia de *Brucella* concordou voltar por unanimidade à "taxonomia clássica" deste gênero (OSTERMAN & MORIYÓN, 2006).

1.2.2 *Brucella* spp. Genômica

A maioria das espécies do gênero *Brucella* tem dois cromossomos circulares, de aproximadamente 2,1 Mbp no cromossomo I (Chr I) e 1,2 Mbp no cromossomo II (Chr II), resultando em um genoma de ~ 3,2 Mbp (EL-SAYED and AWAD, 2018). No total, esses cromossomos carregam 3.296 quadros de leitura aberta (ORF) que são anotados na maioria das espécies como genes, 2.158 no Chr I e 1.138 no Chr II com um teor de guanina-citosina (GC) entre 58-59% (HALLING *et al.*, 2005). O genoma de *B. suis* (bv1) é semelhante as cepas clássicas, mas *B. suis* (bv2) e (bv4) são diferentes, já que um fragmento de 210 kb do cromossomo I foi translocado para o cromossomo 2, assim o cromossomo Chr I ficou menor (1,85 Mb) e cromossomo Chr II maior (1,35 Mbp) (WATTAM *et al.*, 2009). Entretanto, em *B. suis* (bv3), observamos um único replicon circular de 3,3 Mbp (EL-SAYED & AWAD, 2018; MILILLO, 2018).

O cromossomo I codifica a maioria das máquinas metabólicas essenciais para a transcrição, tradução e síntese proteica, e o cromossomo II está representado em genes envolvidos nas vias de utilização de substratos específicos: transporte de membrana, intermediário central e metabolismo energético e regulação (PAULSEN *et al.*, 2002).

1.3. Estrutura, Biossíntese, Genética e Fatores de Virulência

Membros do gênero *Brucella* não têm clássicos fatores de virulência como exotoxinas, cápsulas, formas resistentes, LPS tóxicos, fímbrias, plasmídeos ou sistemas de secreção do tipo III (LAMONTAGNE *et al.*, 2009; LETESSON *et al.*, 2002). Os verdadeiros elementos da virulência de *Brucella* são os determinantes moleculares que lhes permitem invadir, resistir

matança intracelular e atingir seu nicho de replicação nos fagócitos profissionais e não profissionais (MORENO et al., 2002).

Os fatores de virulência que as espécies do gênero *Brucella* apresenta, facilitam a invasão celular e a sobrevivência, revertendo os mecanismos de defesa celular inatos. É muito provável que a bactéria não depende de fatores de virulência isolados para sua patogênese. Em vez disso, a virulência da *Brucella* spp. pode ser um aspecto integrado de sua fisiologia geral em concordância com mediadores. O patógeno pode ser capaz de adaptar extensivamente sua fisiologia em resposta aos microambientes distintos encontrados durante sua vida (VIADAS et al., 2010). Ela pode restringir as funções metabólicas enquanto induz modificações transcriptômicas para se adaptar a um estilo de vida extracelular a intracelular (DE FIGUEIREDO et al., 2015; LAMONTAGNE et al., 2009; ROSSETTI et al., 2013). *Brucella* spp. é capaz de fazer uma remodelação ampla e reversível da composição proteica do envelope celular. Toda essa flexibilidade metabólica é necessária, uma vez que os microambientes da célula hospedeira que *Brucella* spp. se encontra, são muito heterogêneos (LAMONTAGNE et al., 2009).

As bactérias do gênero *Brucella* desenvolveram estratégias capazes de fazer modulação e evasão precisa do sistema imunológico do hospedeiro, inicialmente evitando a imunidade inata, impedindo a montagem eficiente da imunidade adquirida e, finalmente, gerando o estabelecimento de uma infecção crônica. O mecanismo de fixação e entrada nessas células por *Brucella* spp. ainda não foi claramente elucidado (DE FIGUEIREDO et al., 2015). No entanto, vários fatores necessários para a invasão da célula hospedeira e sobrevivência intracelular já foram identificados (GORVEL & MORENO, 2002). Esses fatores incluem o O-LPS (MONREAL et al., 2003), um sistema de secreção do tipo IV codificado pelos genes do operon *virB* (BOSCHIROLI et al., 2002a, 2002b), o sistema de dois componentes BvrS-BvrR (VIADAS et al., 2010), β -1,2-glucano cíclico (HAAG et al., 2010), genes para produzir flagelo (HALLING, 1998) e mecanismos de transferência horizontal de genes (DE FIGUEIREDO ET AL., 2015; PIZARRO-CERDÁ et al., 2000).

1.3.1. Sistemas de secreção de *Brucella* spp.

Os sistemas de secreção desempenham um papel importante papel nas interações patógeno-hospedeiro. Bactérias secretam proteínas através de vários tipos de sistemas de secreção, classificados como tipo I a VI. Com base nas análises das sequências genômicas, observou-se em *Brucella* spp. apresenta três tipos de sistema de secreção (tipos I, IV e V). As

bactérias desse gênero não possui genes que codificam os sistemas de secreção do tipo II, III e VI (SANKARASUBRAMANIAN et al., 2015).

O sistema de secreção tipo I (T1SS) consiste em três proteínas: uma proteína da membrana externa formadora de poros (OMP), uma proteína de fusão de membrana (MFP) e uma proteína de cassete de ligação ao ATP (*ABC*). A T1SS está envolvida no transporte do citoplasma para o ambiente extracelular de substratos não proteicos como β -glucanos cíclicos, polissacarídeos e uma ampla variedade de substratos proteicos como pequenas moléculas de sinalização de peptídeos, incluindo bacteriocinas, citotoxinas pertencentes à família das proteínas RTX, proteases e lipases. As proteínas transportadoras *ABC* provavelmente são o sistema de transporte ativo mais comum, representando mais de dois terços dessa função.

Em *Brucella* spp. o sistema de secreção tipo IV (T4SS) é codificado pelo operon *virB* compreendendo *virB1* a *virB11*, sua localização no cromossoma II sugere a probabilidade de vários eventos de transferência horizontal durante o curso da evolução. O T4SS abrange as duas membranas da bactéria e transloca proteínas através da membrana do vacúolo que contém *Brucella*. (BCV) no citoplasma da célula do hospedeiro, cumprindo um importante papel na maturação do BCV e, portanto, na patogênese bacteriana (POESTER et al., 2013). O operon *virB* é especificamente induzido após a entrada em macrófagos da *Brucella*; a acidificação do fagossomo é um sinal essencial que induz a sua expressão (BOSCHIROLI et al., 2002a; SIEIRA et al., 2000). T4SS injeta diretamente proteínas no BCV mediante um complexo proteico chamado efetores secretados tipo IV (T4SEs), essencial para a sobrevivência de *Brucella* spp. e sua replicação em células hospedeiras infectadas. O T4SS é conservado em todas as *Brucella* spp., mas os T4SEs são dinâmicos. Até agora os T4SEs identificados constitui aproximadamente 1,7 a 3,0% do proteoma total em *Brucella* spp. Portanto, um conjunto específico de efetores T4SEs pode contribuir para as diferenças de virulência ou pode ser pelo menos parcialmente responsáveis pela especificidade do hospedeiro. T4SEs como β -1,2- glucano cíclico se encontra em todas as espécies exceto em *B. pinnipedialis*.

Em *Brucella* spp., o β -1,2- glucano cíclico funciona como um fator de virulência necessário para a sobrevivência intracelular (TSOLIS et al., 2009), modificando a organização e composição de ilhas de lipídios fagossomais para prevenir a fusão entre o BCV e a via endocítica do hospedeiro (ARELLANO-REYNOSO ET AL., 2005; MOLLOY, 2005; MORENO & MORIYÓN, 2002). Os β -1,2- glucano cíclico também pode modificar localmente sua organização para evitar a fusão do fagossomo com lisossomos

independentemente do sistema de secreção T4SS e interajam com o RE (SANKARASUBRAMANIAN et al., 2015).

O sistema de secreção V (T5SS) é o mais o simples agente secretor de proteínas. As proteínas secretadas pelo T5SS são secretadas via o sistema de auto-transportador, ou a via de secreção de dois parceiros. O T5SS atravessa a membrana citoplasmática para o periplasma e subsequentemente a membrana externa. T5SS transporta suas proteínas de maneira desdobrada (SANKARASUBRAMANIAN et al., 2015).

1.3.2. Lipopolissacarídeo

O envelope celular da *Brucella* spp. é composto por uma membrana interna, que consiste em uma bicamada de fosfolipídios e uma membrana externa com uma capa interna de fosfolipídios e uma capa externa de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é considerado um importante fator de virulência em *Brucella* spp. e consiste em três elementos principais: (1) lipídeo A, que fornece a ancoragem do LPS hidrofóbica na membrana externa, (2) um núcleo interno e externo composto de oligossacarídeos de cadeia ramificada, e (3) um O-polissacarídeo (O-PS) ou antígeno O, ligado ao núcleo externo e projetando-se no ambiente extracelular (Figura 1) (HAAG et al., 2010).

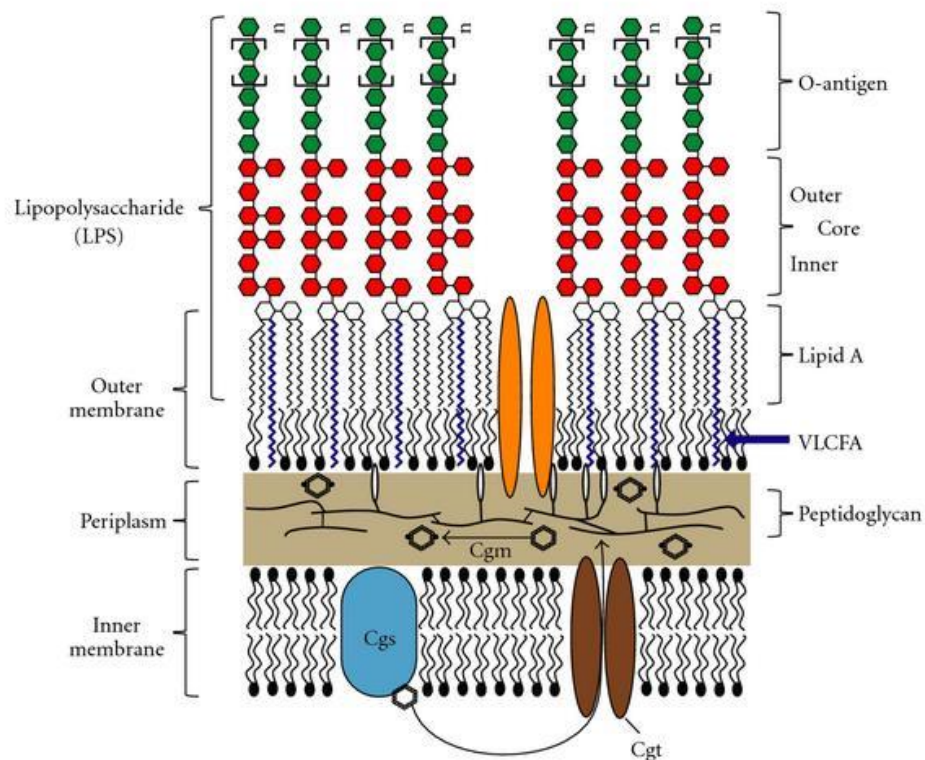


Figura 1. Representação diagramática do envelope celular de *Brucella* spp. Fonte: HAANG et al. (2010).

O lipídeo A tem uma estrutura de diaminoglucose, que é acilada com ácidos graxos saturados e hidroxilados. Além disso, contém um ácido graxo incomum de cadeia muito longa (*Brucella*-C28 em comparação com outras Enterobacteriaceae C12- C16), levando à uma ativação deficiente do complexo receptor de reconhecimento de patógeno (TLR4-MD2) (DE FIGUEIREDO et al., 2015; GŁOWACKA et al., 2018; HAAG et al., 2010; OUAHRANI-BETTACHE et al., 2019).

O núcleo é composto de glicose, manose, 2-amino-2,6-didesoxi-D-glicose (quinovosamina), 2-amino-2-desoxi-D-glicose (glucosamina), ácido 3-desoxi-D-mano. 2-octulosônico (KDO) e outros açúcares ainda não identificados (HAAG ET AL., 2010; OUAHRANI-BETTACHE et al., 2019). Embora a estrutura central não tenha sido resolvida, desempenha um papel na capacidade de evitar o reconhecimento pela resposta imune inata e mostra-se ser essencial para as interações hospedeiro-hospedeiro. O conhecimento sugere que ela contenha um ramo lateral de manose que impede o reconhecimento pelo complemento, peptídeos antimicrobianos e o complexo de receptor de reconhecimento de patógeno TLR4-MD2 (FONTANA et al., 2016; MANCILLA, 2015; PORTE et al., 2003).

O LPS é o principal antígeno de superfície pouco reconhecido pelo sistema imunológico. Embora o LPS da *Brucella* spp. se ligue ao TLR4-MD2, ele não induz a produção de citocinas e peptídeos antimicrobianos porque é menos eficaz na indução da imunidade inata do que outras LPS de bactérias Gram-negativas. Isso é considerado importante para *Brucella* spp. escapar da detecção imunológica e formar uma infecção intracelular crônica (HAAG et al., 2010). O LPS de *Brucella* spp. é um paradigma de molécula pouco endotóxica e, dificilmente, ser é pró-inflamatória, sendo incapaz de ativar em grande quantidade a imunidade inata (MANCILLA, 2015). O LPS desempenha um papel crucial para uma infecção intracelular de sucesso da *Brucella* spp., interferindo nos mecanismos da imunidade inata e adaptativa, para evitar uma resposta imune precoce do hospedeiro e permitindo assim uma infecção intracelular com sucesso (FERNANDEZ-PRADA et al., 2001; GORVEL AND MORENO, 2002; HAAG et al., 2010; MANCILLA, 2015; MILILLO, 2018).

O O-PS é um homopolímero não ramificado linear composto por n-resíduos de N-formil perosamina (4,6 didesoxi-4-formamido- -Dmanopiranosil) (FERNANDEZ-PRADA et al., 2001). Dependendo da presença ou ausência de O-PS, as bactérias do gênero *Brucella* podem ser fenotipicamente categorizados com base na morfologia de sua colônia (OUAHRANI-BETTACHE et al., 2019). *Brucella* spp. caracterizados como lisos (S) contêm

O-PS, enquanto organismos rugosos (R) não expressam o antígeno O (MCQUISTON et al., 1999; MILILLO, 2018). Na maioria das bactérias patogênicas, o antígeno O-PS desempenha um papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, apresentado pelo MHC II das células B, que interage de uma forma que impede a sinalização e ativação de células T e, dependentes de MHC II, também protege a bactéria de peptídeos catiônicos celulares, e metabólitos de oxigênio, além de impedir a produção de citocinas pró-inflamatórias e juntamente com o núcleo, fornece partes receptoras para brucelofagos (CARDOSO et al., 2006).

O O-PS também parece ser essencial para o tipo de entrada da bactéria nas células hospedeiras. As cepas lisas de *Brucella* spp. selecionam balsas lipídicas para entrar na célula hospedeira e adquirindo moléculas marcadoras de balsas lipídicas que são importantes para o direcionamento intracelular do compartimento para o retículo endoplasmático. Os mutantes de R-LPS não entram nas células hospedeiras através de balsas lipídicas, mas através da fagocitose normal e são direcionados para os lisossomas (Figura 2). Entretanto, as variantes R sofrem maior morte intracelular por macrófagos (FERNANDEZ-PRADA et al., 2001). A perda da capacidade de selecionar a porta de entrada e as possíveis interações inespecíficas com as membranas dos compartimentos internos onde a *Brucella* spp. se multiplica, são fatores que podem contribuir para a atenuação nas cepas R (PORTE et al., 2003).

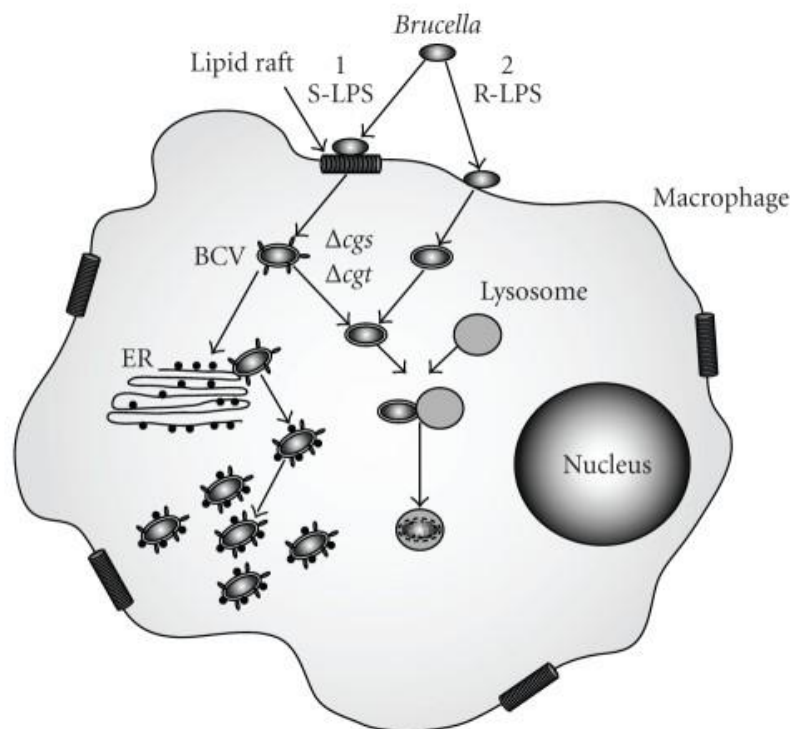


Figura 2. Representação diagramática da interação *Brucella*-macrófago. Fonte: HAANG et al. (2010)

Em geral, as espécies do gênero *Brucella* lisas são mais virulentas do que suas contrapartes rugosas. As espécies *B. canis* e *B. ovis* são as únicas naturalmente rugosas e ainda assim, são patogênicas em suas espécies hospedeiras. Quatro espécies nomeadas como clássicas ocorrem naturalmente na forma lisa e os isolados recém-descobertos das *Brucella* spp. atípicas parecem todos apresentar essa característica (EL-SAYED & AWAD, 2018).

Os determinantes antigênicos envolvidos na sorotipagem com os soros policlonais também são transmitidos pelo O-PS. Através do uso de anticorpos monoclonais (MAbs), várias especificidades de epítomos foram relatadas no O-PS: A, M e epítomos compartilhados pelas cepas dominantes A e M, que foram denominados epítomos comuns C (DIAZ-APARICIO et al., 1993). Além disso, as cepas de *Brucella* spp. lisa compartilham epítomos comuns no O-PS com cepas de reação cruzada, das quais a mais importante é *Yersinia enterocolitica* O: 9 (Diaz-Aparicio et al., 1993; Scholz et al., 2018; Zygmunt et al., 2012)

1.3.3. LPS Dissociação de suave (S) a áspera (R)

O conceito de dissociação está geralmente associado à transição *in vitro* entre colônias liso (S) ou rugoso (R), uma observação fenotípica em bactérias Gram-negativas comumente feita desde o início da microbiologia como ciência. Também é bem conhecido que a perda do O-PS, desencadeia a mudança no fenótipo da colônia. Embora a dissociação esteja relacionada a uma das características mais básicas para distinguir estas espécies, tem sido considerada um artefato de laboratório e, portanto, não ganhou mais atenção (FERNANDEZ-PRADA et al., 2001). No entanto, descobertas recentes sobre a genética e a patogênese dos membros de *Brucella* spp., trouxeram uma nova visão sobre esse fato experimental, sugerindo que ele desempenhe um papel além das observações de laboratório (MANCILLA, 2015). Variação de fase lisa a rugosa pode ocorrer espontaneamente em cepas lisas de *Brucella* spp. como resultado de fatores ambientais, mas o mecanismo molecular responsável por essa variação ainda não foi definido (ADONE et al., 2011).

Sabemos que O-PS é em grande parte responsável pelo comportamento furtivo manifestado pelas células S, portanto, a dissociação não parece desempenhar um papel nas condições de campo. No entanto, em um estudo recente sobre a expressão de LPS de *B. melitensis* em culturas de células infectadas, foi isolado tipos R de camundongos inicialmente infectados com células S (TURSE et al., 2011). Posteriormente, a mesma equipe de pesquisa demonstrou que a citotoxicidade das células R é necessária para a saída e disseminação *in vitro* de células S em *B. melitensis* a partir de células hospedeiras infectadas, sugerindo pela primeira vez um papel biológico para a dissociação (PEI et al., 2014). Os autores

argumentaram que a dissociação é um processo natural que ocorre durante a infecção e a perda da expressão do O-polissacarídeo parece ser estocástica, dando origem a organismos com outras propriedades biológicas além do organismo liso parental durante o curso da infecção (TURSE et al., 2011). Esse fato pode alterar o atual modelo de infecção em que as células S são capazes de induzir a lise celular e se propagar por si mesmas, sem depender de mutantes R (STARR et al., 2012). Esse achado também explicaria a presença de cepas R originárias de espécies S em coleções de cepas de campo (DORNELES et al., 2014). Variantes de *B. melitensis* R foram ocasionalmente isoladas de amostras de leite de cabra, sugerindo que os tipos R podem sobreviver na glândula mamária (MANCILLA et al., 2012). A ideia de que a dissociação pode ocorrer também no ambiente extracelular é apoiada pela descoberta recente de isolados ambientais de *B. microti* desprovidos de O-PS (AL DAHOUK et al., 2012). A reversão (de R para S) *in vivo*, explica a heterogeneidade durante a interação patógeno-hospedeiro (PÉREZ SANCHO, 2014). Pode-se inferir que apenas aquelas mutações que causam tipos R com uma aptidão intracelular equilibrada que permitem a competição com as células S, que por sua vez prevaleceriam. Se *Brucella* spp. tipo S tornou-se uma espécie com tendência a dissociação, capaz de alterar sua "credencial de patógeno", ainda é uma especulação. Mas, o aparecimento de tipos R *in vitro* e *in vivo* sugere que as *Brucella* spp. podem não apenas experimentar heterogeneidade fenotípica, sendo esse fato necessário para a virulência das células S (MANCILLA, 2015).

1.3.4. Lipoproteínas

Associadas ao LPS e fazendo parte da membrana estão as proteínas da membrana externa (Omps), muitas das quais foram caracterizadas do ponto de vista genético, imunológico, estrutural e funcional. As proteínas da membrana externa (Omp) estão mais expostas em espécies de *Brucella* tipo R do que em tipo S (GONZÁLEZ et al., 2008). Essas proteínas foram divididas em 3 grupos de acordo com seu peso molecular:

1. Grupo 1 (88 ou 94 kDa) (Omp19, Omp16 e Omp10): são chamados de Omps "menores"
2. Grupo 2 (36-38 kDa) (Omp2a e Omp2b): foram classificados como porinas e lipoproteínas
3. Grupo 3 (25-27 e 31-34 kDa): (Omp25 e Omp31) são encontrados em maior quantidade e são conhecidos como Omps "principais".

Esses três grupos de proteínas são expostos na membrana externa e são reconhecidos pelo sistema imunológico no curso da infecção. Vários estudos confirmaram a imunogenicidade do Omps e sua possível utilidade na geração de vacinas (SALVADOR-BESCÓS et al., 2018).

1.3.5. Sistema de dois componentes *BvrR / BvrS*

Bactérias intracelulares/extracelulares facultativas, como *Brucella* spp., devem sobreviver, desde o ambiente aberto até o meio intracelular (KÖHLER et al., 2003; LAMONTAGNE et al., 2009). Para isso, deve coordenar uma intrincada rede de fatores para gerar uma resposta adaptativa adequada em condições ambientais variadas. Este atributo é frequentemente realizado por sistemas de transdução de dois componentes. Embora o sequenciamento do genoma tenha revelado 21 supostos sistemas regulatórios de dois componentes no gênero *Brucella*, até agora, *BvrR/BvrS* é o sistema regulatório de dois componentes mais bem caracterizado e implicado em muitas funções da virulência de *Brucella* spp. (TSOLIS et al., 2009; VIADAS et al., 2010).

O sistema *BvrR/BvrS* regula a transcrição de pelo menos duas proteínas principais da membrana externa, *Omp22* e *Omp25a* e está envolvido nas alterações do envelope celular necessárias à adaptação ao ambiente intracelular, conforme mostra um estudo realizado em mutantes de *B. abortus*, em que estas cepas mutantes apresentavam estrutura de membrana externa alterada, maior suscetibilidade a substâncias bactericidas policatiônicas e uma superfície de membrana externa mais hidrofóbica do que a cepa original. Os mutantes de *B. abortus* não foram virulentos em camundongos, mostrando-se ser menos invasivos em células epiteliais e macrófagos, sendo incapazes de inibir a fusão dos lisossomas e a replicação intracelular (VIADAS et al., 2010).

1.3.6. Pseudogenes, deleção de gene ou aquisição de gene

Várias pequenas deleções nas espécies *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* apoiam a noção de que estão intimamente relacionados entre si. Um total de 207 pseudogenes foram identificados no genoma de *B. abortus*, enquanto 152 e 82 foram identificados em *B. melitensis* e *B. suis*, respectivamente. Do conjunto total de genes inativados, 16 pseudogenes são comuns entre três espécies, 57 são compartilhados por *B. abortus* e *B. melitensis*, e apenas 6 e 5 são compartilhados entre *B. suis* e *B. abortus*, e entre *B. suis* e *B. melitensis*, respectivamente. É importante notar que os pseudogenes compartilhados são o resultado de mutações independentes e não representam características herdadas comumente. Entre os 16 pseudogenes comuns entre três espécies, 9 foram gerados pelo mesmo evento, sugerindo fortemente que foram adquiridos pelo ancestral comum de todas as bactérias do gênero *Brucella*. Da mesma forma, a maioria dos 56 pseudogenes compartilhados por *B. abortus* e *B. melitensis* tem mesma mutação (CHAIN et al., 2005).

As análises das categorias funcionais dos genes inativados em *Brucella* spp. revelou que um terço pertence à categoria de transporte celular e envelope, 10% pertencem à regulação da transcrição e transdução de sinal e 6% pertencem às categorias de produção e conversão de energia. Este processo de redução pode ser consequência da adaptação ao estilo de vida intracelular em um ambiente local protegido e mais estável, que fornece constante nutrientes, enquanto o acúmulo diferente de reguladores transcricionais pode representar uma contribuição ou ser a consequência do processo de adaptação a um determinado animal hospedeiro. A perda de genes pode contribuir para diferenças de virulência entre espécies do mesmo gênero. Assim, parece que a inativação do gene, ao invés da deleção ou aquisição do gene (via transferência horizontal), pode desempenhar um papel mais importante na especiação e adaptação deste grupo patogênico ao hospedeiro. Isso sugere que as diferenças na virulência e especificidade do hospedeiro observadas entre as três espécies podem ser o resultado da divergência impulsionada pelo acúmulo diferencial de pseudogenes dentro das funções regulatórias na *Brucella* spp (CHAIN et al., 2005).

1.3.7. Flagelo

Durante a evolução, as bactérias do gênero *Brucella* clássica acumulou mutações que levaram à formação de vários pseudogenes (genes inativados no curso da evolução), entre eles, os pseudogenes relacionados aos flagelos (CHAIN et al., 2005; LETESSON et al., 2002; TSOLIS et al., 2009). Embora a maioria das espécies sejam consideradas sem movimento, os genomas das espécies clássicas contêm todos os genes necessários para montar um flagelo ativo, mas vários são pseudogenes (AL DAHOUK et al., 2017; COLOMA-RIVERO et al., 2020; FRETIN et al., 2005; LÉONARD et al., 2007). A perda da sua motilidade pode ter acontecido porque não era essencial para seu ciclo infeccioso ou porque era uma desvantagem para seu estilo de vida como patógenos animais (HALLING, 1998). Apesar dessas mutações, em condições específicas de crescimento, algumas cepas de *Brucella* spp. tem evidenciado que podem formar um flagelo revestido que não confere motilidade, mas é necessário para a virulência (FRETIN et al., 2005; PETERSEN et al., 2011). A motilidade evidenciada em algumas cepas de *Brucella* spp. é provavelmente uma propriedade residual de ancestrais ambientais que poderia fornecer uma grande vantagem ao permitir que ela se movesse para um nicho favorável. Compreender o papel dessa motilidade na virulência dessas cepas e seu estilo de vida intracelular exigirá mais estudos (SOLER-LLORENS et al., 2016). Recentemente *Brucella abortus* foi descrita expressando um flagelo polar sob certas condições, mas sua função ainda é desconhecida (Figura 3) (AL DAHOUK et al., 2017).

Também foi reconhecida uma proteína FlgJ, presumivelmente envolvida na formação do flagelo e na virulência de *B. abortus*. Estudos *in vitro* mostraram que a eliminação do gene *flgJ* retarda a taxa de crescimento de *B. abortus* na cultura, reduz sua capacidade de sobrevivência intracelular em células fagocíticas profissionais e não profissionais, tornando-a incapaz de escapar da via endocítica e não atingir o retículo endoplasmático. Além disso, a produção da proteína FlgJ foi encontrada associada à adesão bacteriana. Outros estudos também demonstraram que *Brucella melitensis* possui 31 genes flagelares e constrói, sob condições estritamente definidas, um flagelo polar necessário para a virulência (LÉONARD et al., 2007). Portanto, embora a função específica do flagelo polar para *Brucella* spp. seja desconhecida, os dados indicam que o gene flagelar *flgJ* e seu produto são necessários para a virulência de *Brucella* spp., uma vez que sua deleção reduz significativamente a aptidão deste patógeno *in vitro* e *in vivo* (COLOMA-RIVERO et al., 2020).

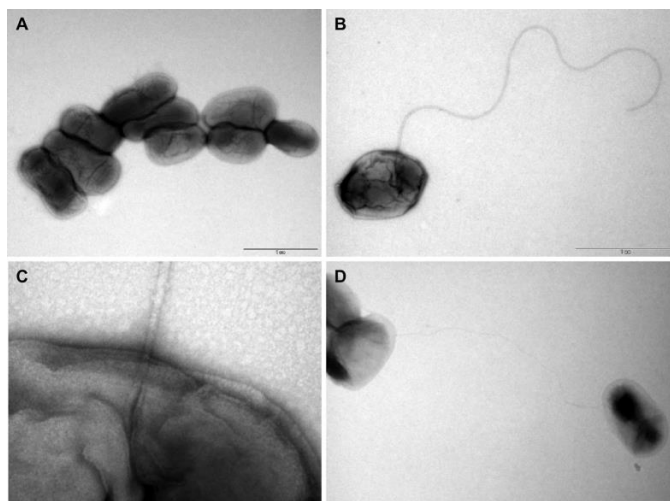


Figura 3. (A) Micrografias eletrônicas de *Brucella* spp. Flagelado isolado de rãs-touro africanas. (B, C) Algumas bactérias com flagelos polares. Fonte: AL DAHOUK et al. (2017)

Análise dos genes dos flagelos nas cepas atípicas B13-0095, BO1 e BO2 mostraram que todos os genes eram totalmente funcionais, o que provavelmente explica a mobilidade dessas cepas. A mobilidade pode proporcionar uma vantagem nas diferentes etapas do seu ciclo patogênico: atingir o hospedeiro, invadir e colonizar as células hospedeiras e se dispersar para novos hospedeiros (HALLING, 1998; SOLER-LLORÉNS et al., 2016).

1.3.8. *Transferência horizontal de genes*

Existe a hipótese de que os membros clássicos de *Brucella* spp. emergiram de bactérias do solo caracterizados por motilidade e uma ampla atividade metabólica. Embora seja provável que mais espécies do gênero *Brucella* do clado clássico sejam descobertas, as espécies dentro das novas linhagens atípicas e sua diversidade genética desafiam nossos

conceitos do que define *Brucella* (AL DAHOUK et al., 2017). Essa diversidade pode vir da capacidade das espécies atípicas de trocar DNA, por meio da transferência horizontal de genes, entre si e com outros microrganismos no ambiente. Análises comparativas do genoma revelaram um conjunto de genes presentes nos cromossomos de linhagens isoladas da Rã-touro africana, que não são encontrados em outras espécies do gênero *Brucella*, mas são encontrados em bactérias do solo, como *Rhizobium* e *Agrobacterium* (AL DAHOUK et al., 2017). Ao contrário de parentes associados ao solo ou plantas, que abrigam fatores de virulência, como plasmídeos e fagos temperados, necessários para sobreviver em condições ambientais adversas que mudam rapidamente, ter esses tipos de genes parece ser supérfluo para um organismo adaptado à sobrevivência intracelular. Recentemente, também foi descoberto um fago temperado residindo no isolado humano de *B. inopinata* que era muito semelhante a um fago temperado de *O. anthropi* e vários profagos identificados em *Rhizobium*. Esses achados e a detecção de estruturas semelhantes a pili em *Brucella* sp. isoladas de Rãs-touro africanas podem sugerir que a transferência horizontal de genes ocorre entre *Brucella* spp. com bactérias associadas ao solo (AL DAHOUK et al., 2017).

A transferência horizontal de genes pode ser uma força motriz na evolução das bactérias do gênero *Brucella* atípica (SCHOLZ et al., 2016), embora na *Brucella* spp. clássicas a evolução tenha sido considerada mais um evento clonal com raros eventos de transferência horizontal de genes (WATTAM et al., 2014, 2009; WHATMORE, 2009). Das espécies clássicas apenas *B. suis* adquiriu lateralmente genes específicos da espécie, localizados dentro de um único grupo no cromossomo II e parece ter sido adquirido recentemente por meio de um evento de integração mediado por fago (PAULSEN et al., 2002).

1.4. Patogêneses: *Brucella* spp. são parasitos de grande sucesso

Brucella spp. são micróbios furtivos que tendem à cronicidade em vez de causar infecção aguda fatal. Este patógeno precisa de seus hospedeiros vivos para manter sua sobrevivência. Ao longo de sua evolução, as bactérias do gênero *Brucella* desenvolveram estratégias dinâmicas para escapar do reconhecimento e ataques do sistema imunológico, para modular a resposta imunológica adquirida do hospedeiro e para escapar da inativação intracelular (EL-SAYED & AWAD, 2018).

A infecção por bactérias do gênero *Brucella* é dividida em três fases: na primeira, o patógeno invade o hospedeiro em 2 dias após a infecção; na segunda fase, o patógeno se replica em diferentes órgãos dos sistemas retículo-endotelial e reprodutivo de 2 dias a 3

semanas, o que é conhecido como fase aguda de infecção, enquanto na terceira fase, o patógeno apresenta diferenças na patologia de vários tecidos e dura de até 6 meses a 1 ano ou mais, conhecida como fase crônica (GRILLÓ et al., 2012; MARTIROSYAN et al., 2011). Durante a fase crônica, o número de bactérias atinge um nível máximo no baço e no fígado (de 7 a 12 semanas), seguido pelo declínio onde o número de bactérias diminui e são eliminadas (MARTIROSYAN et al., 2011; MARTIROSYAN & GORVEL, 2013). De acordo com o hospedeiro, o curso destas fases pode variar e depende da bactéria (cepa, virulência, dose e via de inoculação) e de certos parâmetros do hospedeiro, incluindo raça, histórico genético, idade, sexo e estado fisiológico (GRILLÓ et al., 2012).

O agente etiológico da brucelose desenvolveu estratégias específicas para influenciar a apresentação de antígenos mediados por células. Há evidências crescentes de que a *Brucella* spp. também modula eventos de sinalização durante as respostas imunes adaptativas do hospedeiro. Seu alvo reprodutivo preferencial corresponde ao meio intracelular de macrófagos, células dendríticas e trofoblastos placentários (MARTIROSYAN et al., 2011).

Brucella spp. comportam-se primariamente como parasitos intracelulares facultativos de fagócitos profissionais e não profissionais, uma habilidade que depende de vários fatores de virulência, principalmente um sistema de secreção do tipo IV e uma estrutura peculiar da membrana externa. Os componentes críticos da membrana, como o O-LPS, lipoproteínas e lipídios, diferem em detalhes moleculares relevantes das moléculas homólogas, que em outras bactérias carregam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), facilmente detectados por receptores de reconhecimento de padrões de imunidade (PRRs). O O-LPS de bactérias do gênero *Brucella* carrega as modificações mais significativas do PAMPs e, portanto, é um fator de virulência importante (LAPAQUE et al., 2005). *Brucella* spp. induzem respostas pró-inflamatórias comparativamente baixas e atrasadas, que criam uma janela de tempo permitindo que o patógeno trafegue intracelularmente em células dendríticas e macrófagos para alcançar um alvo seguro antes que ocorra a ativação efetiva dos fagócitos (LAPAQUE et al., 2005; SALVADOR-BESCÓS et al., 2018).

Na infecção inicial, a bactéria tem que sobreviver ao ambiente extracelular e, para isso, apresenta uma variedade de recursos defensivos. Seu LPS de baixa capacidade endotóxico, sua resistência ao sistema de complemento, ataques mediados por peptidasa catiônica, bem como a proteção contra o reconhecimento das PAMPs, aumenta a sobrevivência de *Brucella* spp. antes de atingir o macrófago. Lá, a bactéria finalmente tem a chance de se esconder (LAPAQUE et al., 2005; SALVADOR-BESCÓS et al., 2018)..

As bactérias do gênero *Brucella* são levadas para um fagossoma, este é direcionado para o retículo endoplasmático, que é o alvo replicativo da *Brucella* spp. dentro do hospedeiro. A evasão do sistema imunológico do organismo hospedeiro e o direcionamento da bactéria ao seu alvo replicativo são de fundamental importância para o processo de infecção. O envelope da célula bacteriana é o principal ponto de interação entre as espécies do gênero *Brucella* e o hospedeiro e, como tal, as moléculas dentro do envelope da célula bacteriana desempenham um papel significativo no processo de infecção (HAAG et al., 2010).

Ao entrar nas células fagocíticas ou não fagocíticas, a *Brucella* spp. é englobado dentro de um compartimento ligado à membrana denominado vacúolo contendo *Brucella* (BCV). O fagossomo é funcionalmente modificado pela bactéria para residir nas primeiras 8 a 12 h após a infecção. O BCV trafega ao longo da via endocítica, sofrendo maturação e adquirindo marcadores de membrana endossômica, por meio de interações sequenciais com endossomos e lisossomos iniciais transitórios (receptor de transferrina, o pequeno GTP de ligação proteína Rab5 ou o antígeno endossômico inicial (EEA1)) e tardios (proteína de membrana associada ao lisossoma 1 (LAMP1)), BCV precisa atingir um pH de 4.5, para se tornar um vacúolo endossômico acidificado contendo *Brucella* (eBCV), e fazer um processo completo de maturação fagossômica (FUGIER et al., 2007). A GTPase Rab7 do hospedeiro contribui para a maturação do eBCV, e promovem pela bactéria a expressão do sistema de secreção VirB Tipo IV (T4SS), que translouca proteínas efetoras para mediar as interações do eBCV com o local de saída do retículo endoplasmático (RE). Esses eventos levam à biogênese dos vacúolos contendo *Brucella* spp. replicativos (rBCV) sequestrando elementos do RE. Uma vez dentro do rBCV, as bactérias são resistentes a novos ataques e começam a multiplicar-se. As bactérias passam então por uma replicação extensiva nos rBCV entre 12 e 48 h após infecção, posteriormente os rBCV são capturados dentro de estruturas semelhantes a autofagossomos de maneira dependente de VirB T4SS, para se tornar vacúolos contendo *Brucella* autofágicos (aBCV). Os aBCV abrigam recursos de autolisossomos e são necessários para saída bacteriana e novos ciclos de infecções intracelulares (STARR et al., 2012). A conversão da rBCV em um compartimento com características autofágicas aBCV permite que a bactéria se espalhe de célula a célula, após um ciclo de correr e se esconder para estabelecer uma infecção crônica (FUGIER ET AL., 2007; LAMONTAGNE et al., 2009).

No entanto, as bactérias do gênero *Brucella* devem enfrentar um segundo desafio se quiserem persistir por um longo tempo no hospedeiro. Eles devem ser capazes de encontrar uma maneira de evitar a vigilância imunológica dos linfócitos T efetores específicos. Quando

a infecção ocorre, o sistema imune do hospedeiro gera uma resposta pro-inflamatória que desencadeia que as células T induzam células T *Brucella*-específicas (CD4⁺, CD8⁺ citotóxicas e outras). As CD4⁺ expressam IFN- γ e outros fatores que consegue controlar a infecção mediante a inativação do macrófago e a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade MHC-II que a sua vez melhora apresentação do antígeno as células T. A bactéria metabolicamente ativa através de suas lipoproteínas de membrana como a Omp19, e pela via TLR2 (Toll-like receptors (TLRs)) induzem secreção de IL6 que incrementam a transcrição de reguladores negativos para IFN- γ (diminuí sua produção), inibem os mRNA para a transcrição de genes do MHC-II e reduz sua expressão (BARRIONUEVO & GIAMBARTOLOMEI, 2019). No final se reduz a apresentação de antígenos de *Brucella* spp. as células T CD8⁺ citotóxicas, causando uma diminuição em sua funcionalidade e permitindo que elas escapem e estabeleçam uma infecção crônica (BARRIONUEVO & GIAMBARTOLOMEI, 2019).

As espécies do gênero *Brucella* se replicam em fagócitos profissionais e não profissionais sem afetar a viabilidade celular. O patógeno, consegue desativar a apoptose celular, e praticamente torna a célula imortal, permitindo sua própria sobrevivência. Porém o termo “erradicação microbiológica” é questionável para a *Brucella* spp. (VRIONI et al., 2008).

1.5. Epidemiologia da Bruceloses em animais

1.5.1. Distribuição geográfica da doença

No mundo, *B. abortus* é identificado como sendo responsável por mais de 80% da brucelose bovina. Desta espécie, atualmente oito biovars são conhecidos 1-6, 7 e 9 que apresentam variações principalmente em sua distribuição geográfica com importância epidemiológica (NAVARRO et al., 2002). *B. abortus* é encontrado em todo o mundo em regiões de pecuária, exceto no Japão, Canadá, alguns países europeus, Austrália, Nova Zelândia e Israel, onde foi erradicado. No 2008 foi declarado a eliminação da brucelose em bovinos nos Estados Unidos. Atualmente, o alce (*Cervus elaphus nelsoni*) e o bisão (*Bison bison*) da área metropolitana de Yellowstone, são os únicos hospedeiros reservatórios de *B. abortus* no país (AUNE ET AL., 2012; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017; CROSS et al., 2013; ZHELUDKOV & TSIRELSON, 2010). Na América Latina a doença está presente em todos os países, alguns como México e Peru com prevalências muito altas (> 10%) e outros como Uruguai, cuja prevalência é muito baixa (< 0,5%), mas ainda ocorrem surtos isolados (SAMARTINO & EDDI, 2010). Os biovars de *B.*

abortus conhecidos na América Latina são 1, 2, 3, 4 e 6 (LUCERO et al., 2008). Na Colômbia, apenas o biovar-1 foi relatado, no entanto, uma investigação recente descreveu o primeiro isolamento do biovar 4 (PACHECO-MONTEALEGRE et al., 2017), que ainda não foi confirmado pela autoridade sanitária oficial. Na Colômbia as perdas econômicas devido à infecção por *B. abortus* pode atingir até \$ 2,300 US por animal/ano (ARENAS & MORENO, 2016). Os resultados descritos neste estudo são consistentes com relatórios de perda estimativas econômicas do ICA, que variou entre \$ 1,000 e 3,000 US por animal/ano, dependendo do sistema de produção (OVIEDO-PASTRANA et al., 2017).

B. melitensis é particularmente comum no Mediterrâneo, também ocorre no Oriente Médio, Ásia Central, ao redor do Golfo Pérsico e em alguns países da América Central. Este organismo foi relatado na África e na Índia, mas não parece ser endêmico no norte da Europa, América do Norte (exceto México), sudeste da Ásia, Austrália ou Nova Zelândia. Houve relatos de incidência anual de até 78 casos por 100.000 pessoas no Mediterrâneo e no Oriente Médio. Em alguns países onde os animais são controlados, como o sul da Europa, incidência de 77 casos por 100.000 pessoas são relatados anualmente. Uma taxa de soroprevalência de 20% foi identificada na Península Arábica, com mais de 2% tendo brucelose ativa. Aproximadamente 100 a 200 casos por ano são relatados nos EUA, a maioria deles na Califórnia e no Texas em associação com o consumo de queijos não pasteurizados (CÁRDENAS et al., 2019a; MORENO, 2002). Na Colômbia apesar de considerar inexistente a presença de *B. melitensis* foi recentemente confirmado um caso de infecção numa mulher grávida de 17 anos da zona rural do Cauca (MONDRAGÓN-LENIS et al., 2020)

B. suis, apresenta cinco biovars identificados. Os biovars 1 e 3 são considerados de distribuição mundial, enquanto os outros têm distribuição geográfica limitada. *B. suis* biovar 1 se estabeleceu no gado do Brasil e da Colômbia. *B. suis* biovar 2 é encontrado principalmente na Europa e é enzoótico em lebres selvagens, o que representa um problema quando os suínos têm contato direto com essa população infectada. *B. suis* biovar 2 também ocorre em javalis em grande parte da Europa. *B. suis* biovar 4 está limitada às regiões árticas da América do Norte e Rússia. *B. suis* biovar 5 (brucelose murina) ocorre nos estados pós-soviéticos. *Brucella suis* foi erradicada de porcos domesticados nos EUA, Canadá, muitos países europeus e outras nações. No entanto, persiste em populações de suínos selvagens em algumas áreas, incluindo os EUA, Europa e Austrália (ZHELUDKOV & TSIRELSON, 2010). Surtos esporádicos são relatados em rebanhos domesticados ou humanos devido à transmissão desta fonte (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2018).

Por motivos religiosos no consumo de suínos, há baixas taxas de incidência no Oriente Médio, Norte da África e Índia.

B. canis provavelmente ocorre em quase todo o mundo; entretanto, a Nova Zelândia e a Austrália parecem estar livres desse organismo. A prevalência da infecção é desconhecida, embora pesquisas sorológicas de *B. canis* tenham encontrado taxas de 1 a 19% nos EUA, até 28% no México e 30% na América Central e do Sul. As infecções humanas por *B. canis* parecem ser incomuns, mas tem sido relatadas (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2018).

A bactérias parecem ser comuns em mamíferos marinhos. Duas espécies foram reconhecidas até o momento: *B. ceti*, que circula principalmente em cetáceos (baleias, botos e golfinhos), e *B. pinnipedialis*, que infecta principalmente pinípedes (focas, leões marinhos e morsas). Esses organismos parecem infectar muitos animais sem causar sinais clínicos, no entanto, as infecções também foram associadas a perdas reprodutivas, meningoencefalite, orquite, artrite, discopondilite, abscessos subcutâneos e outras síndromes. A grande maioria dos casos clínicos foram causados por *Brucella ceti*. Existem preocupações sobre os efeitos da brucelose em mamíferos marinhos ameaçados além de parecerem ser capazes de infectar alguns mamíferos terrestres. Animais com cultura positiva ou soropositivos foram encontrados no Oceano Atlântico Norte, no Mar Mediterrâneo e no Ártico, incluindo o Mar de Barents. Animais infectados ou expostos também foram encontrados ao longo das costas do Atlântico e Pacífico da América do Norte, nas costas do Peru, Austrália, Nova Zelândia e Havaí; e nas Ilhas Salomão e na Antártica. Casos clínicos foram relatados em humanos, incluindo quatro casos em pessoas que não tiveram exposição aparente a mamíferos marinhos e podem ter sido expostos através do ambiente ou frutos do mar mal cozidos (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2018).

1.5.2. Sinais clínicos

Os sinais característicos, mas não específicos, da brucelose na maioria dos hospedeiros animais são aborto ou partos prematuros e placenta retida (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). A interferência na fertilidade é geralmente temporária e a maioria dos animais infectados aborta apenas uma vez e alguns animais não são afetados (POESTER et al., 2013). Em outras espécies, os higromas e abscessos são os principais sinais clínicos. O úbere costuma estar permanentemente infectado com ejeção de bactérias no leite e ocorre uma reação inflamatória intersticial leve na glândula mamária (mastites intersticiais), especialmente no caso de vacas, cabras, e camelos situação de importância para a saúde

pública. (BERCOVICH, 1998; EWALT et al., 1997; MIRANDA et al., 2016; PACHECO, 2007).

Infecções em ovelhas resultam em orquite ou epididimite no caso de *B. melitensis* e *B. ovis*. Em cabras, bovinos, suínos e cães, complicações semelhantes podem ocorrer após a infecção por *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* e *B. canis*, respectivamente. A artrite também pode ser um sinal em ovelhas e cabras infectadas com *B. melitensis*. A anormalidade mais comum associada à brucelose em cavalos é a bursite supurativa, uma inflamação do tecido conjuntivo cheia de pus nos ombros ou na nuca (ABO-SHEHADA, 2009; CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2018). Os sinais clínicos de brucelose em camelos parecem ser muito raros (CORBEL, 1997; CORBEL, 2006).

B. suis, o agente etiológico da brucelose suína, consiste em 5 biovars, sendo o biovar 2 raramente zoonótico, entre tanto os biovars 1 e 3 são extremamente patogênicos. A estreita relação entre *B. canis* e *B. suis* permitiu que o *B. suis* ressurgisse recentemente entre cães, causando graves problemas reprodutivos em cães e riscos à saúde de seres humanos em contato com cães doentes (EL-SAYED & AWAD, 2018). *Brucella suis* biovar 1 pode naturalmente infectar bovinos, o organismo pode ser derramado no leite e até por dois anos sendo um risco potencial para a saúde das pessoas (EWALT et al., 1997). Os Bovinos, cavalos, ovelhas e veados em contato podem ter infecção por *B. suis* (EL-SAYED & AWAD, 2018)

Os cães são hospedes naturais de *B. canis*, mas também podem adquirir infecção por *B. abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis* de ruminantes ou suínos abortados, geralmente por ingestão material fetal ou placentário. Estes animais podem excretar as bactérias e se destacar como potencial transportador, quando mantidos próximos a outros animais infectado e inclusive ao homem (LUCERO et al., 2008)

B. neotomae foi isolado nos órgãos de ratos e mostrou-se patogênico para esses animais. Foi considerada há 60 anos uma bactéria não zoonótica e, portanto, sem risco de humanos. No entanto toda o análises do genoma de *B. neotomae* revelou que possui o mesmo arsenal de virulência que as espécies do gênero *Brucella* clássicas (VILLALOBOS-VINDAS et al., 2017; WALDROP & SRIRANGANATHAN, 2019), seu potencial como patógeno humano foi confirmado com o isolamento de *B. neotomae* do líquido cefalorraquidiano de dois pacientes, despertando um interesse renovado em compreender melhor sua patogenicidade (VILLALOBOS-VINDAS et al., 2017).

Em estudos experimentais foi demonstrado que *B. microti* é altamente patogênico para camundongos e leva à morte em uma dose de inoculação mais baixa, mais rapidamente do que *Brucella suis* (JIMÉNEZ DE BAGÜÉS et al., 2010; OUAHRANI-BETTACHE et al., 2019). O risco potencial do surgimento de *B. microti* como patógeno em humanos e na pecuária está ligado aos seus reservatórios de vida selvagem, com risco aumentado de transmissão direta ou indireta ao homem. O *Microtus arvalis* de quem foi isolado *B. microti* (HUBÁLEK et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008b) é uma importante fonte de alimento para um número considerável de predadores (incluindo corujas, raposas e javalis), ela pode desempenhar um papel fundamental na disseminação da *Brucella* spp.. Assim mesmo o solo também é um habitat de *B. microti*. Trabalhos adicionais serão necessários para identificar os reservatórios naturais e modos de transmissão de *B. microti* e investigar sua possível patogenicidade em animais criados na agricultura (OUAHRANI-BETTACHE et al., 2019).

1.5.3. Transmissão

A brucelose é uma doença que afeta muitas espécies animais, mas principalmente aqueles que produzem alimentos: ovelhas, cabras, bovinos e porcos e, em algumas espécies selvagens como camelos, lebres, iaques e renas. *Brucella* spp. não tem estrita especificidade de hospedeiro (ZHELUDKOV & TSIRELSON, 2010). A transmissão de animal para animal ocorre como resultado do grande número de organismos eliminados no meio ambiente. Cinco das seis espécies clássicas de *Brucella* spp. causam infecção e sinais clínicos em um ou mais animais hospedeiros, e quatro deles também causam doenças humanas: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* em ordem decrescente de patogenicidade (CORBEL, 1997; CORBEL, 2006). Os tipos recentemente reconhecidos associados a animais marinhos também podem ter a capacidade de causar doenças em humanos (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2018).

A pecuária mista permite melhorar a transmissão entre espécies para hospedeiros não preferidos. A transmissão cruzada de espécies do gênero *Brucella* para hospedeiros periféricos complica muito o diagnóstico de brucelose em animais e humanos (SALEEM, 2019).

Brucella spp. são adquiridos por ingestão, inalação, inoculação conjuntival, e pelo contacto da pele ou fômites contaminados (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Uma fonte significativa de infecção por *Brucella* spp. são animais que excretam o organismo, as bactérias são encontradas em tecidos e fluidos associados à gravidez, o úbere e os gânglios linfáticos que drenam as áreas relevantes (CORBEL, 1997;. CORBEL, 2006). Um

útero gravido sustenta ao microrganismo (BERCOVICH, 1998). A transmissão geralmente ocorre por contato com a placenta, feto, fluidos fetais e secreções vaginais infectados, porquanto os animais são maiormente infecciosos após um aborto ou parto a termo, no qual uma placenta altamente colonizada pode conter até 10^{13} UFC por gramo de tecido (ATLURI et al., 2011). No entanto, se não grávidas, esses animais podem permanecer assintomáticos, sem sinais clínicos ou patológicos evidentes, mas ainda eliminam a bactéria por meio de secreções (BERCOVICH, 1998). Espécies do gênero *Brucella* também foram detectadas em outras secreções e excreções, incluindo leite, urina, fezes, fluidos de higroma, saliva e secreções nasais e oculares. Na maioria dos casos, essas fontes parecem ser relativamente sem importância na transmissão; no entanto, alguns podem ajudar a explicar a transmissão não venérea direta entre animais (XAVIER et al., 2009).

A gravidade da doença depende de muitos fatores, como vacinação, idade, sexo e manejo. Os abortos são mais prevalentes em animais não vacinados e o número de organismos eliminados são muito maiores (CORBEL, 1997; CORBEL, 2006).

As bacteremias persistentes são comuns nos suínos e cães. Em outras espécies animais, a bacteremia ocorre durante o curso da infecção, mas geralmente é intermitente e de curta duração (CORBEL, 1997; CORBEL, 2006).

1.5.4. Sobrevivência

Brucella spp. pode sobreviver por longos períodos em pó, esterco, lã, feno, água, chorume, fetos abortados, solo, carne e leite fresca ou produtos lácteos sem processos de pasteurização. A duração precisa da sobrevivência depende de muitas variáveis, como a natureza do substrato, número de organismos, temperatura, umidade, pH, luz solar, presença de outras substâncias microbianas (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2018; CORBEL, 2006).

Em rebanhos em que a brucelose é adquirida por inalação, pode ser resultado da exposição a poeira ou esterco seco contaminado, além da ingestão de fontes de água contaminadas por animais abortados ou pelo escoamento da água da chuva em áreas contaminadas (CORBEL, 2006). *B. abortus* pode sobreviver até cinco horas sob luz solar direta, cinco dias na urina, três meses em solo contaminado ou no feno mantido em condições úmidas e até nove meses no feto, se forem mantidos em condições de umidade (XAVIER et al., 2009). *Brucella* spp. tem capacidade de utilizar metabolicamente moléculas de origem vegetal, como por exemplo *B. suis*, que tem a capacidade de usar compostos derivados de plantas através de uma via beta-cetoadipato e uma via homoprotocatecate, codificada em Chr

II. Essas vias metabólicas são amplamente distribuídas entre vários microrganismos do solo e desempenham um papel central no processamento e degradação de compostos aromáticos derivados de plantas (PAULSEN et al., 2002)

Assim, uma boa higiene é essencial no momento do aborto ou parto, sendo que qualquer desinfetante comum elimina a presença de *Brucella* spp. Todos os materiais contaminados devem ser desinfectados além do feto morto, devendo ser enterrado ou queimado. (ROBINSON, 2003a).

1.6. Infecção na fêmea e progênie

Nas infecções naturais, é difícil medir o período de incubação (desde o momento da infecção até os primeiros sintomas), pois não é possível determinar o momento da infecção que pode mudar de acordo com fatores como a virulência, a dose da bactéria, a via de infecção e a suscetibilidade do animal (ACHA & SZYFRES, 2005). O período de incubação da brucelose em bovinos e outros animais é bastante variável, cerca de 2 semanas a 1 ano e é inversamente proporcional ao desenvolvimento fetal: quanto mais avançada a gravidez, menor é o período de incubação. Quando o aborto é o primeiro sinal observado, o período mínimo de incubação é de aproximadamente 30 dias. Alguns animais abortam antes de desenvolver uma reação positiva ao teste de diagnóstico. Outros animais infectados nunca abortam e, geralmente, desenvolvem uma reação positiva ao teste diagnóstico dentro de 30 a 60 dias após a infecção, embora alguns possam não desenvolver uma reação positiva por vários meses a mais de um ano (JIM QUIGLEY, 2005). O aborto pode ocorrer dentro de 2 semanas ou até 5 meses após a infecção, mas a gravidez pode terminar também com um bezerro natimorto ou fraco. Não existe cura para a brucelose em animais e não é permitido o tratamento, sendo a única medida de controle o abate dos animais positivos (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Ocasionalmente, os animais podem se recuperar após um período, mas permanecem atuando como fontes perigosas de infecção para outros animais e para o homem (JIM QUIGLEY, 2005).

A brucelose em bovinos geralmente causa abortos no terceiro trimestre de gestação, quando o gado é exposto ao organismo infeccioso. As fêmeas grávidas não apresentam sintomas clínicos até o final da gestação ou até que tenham parido ou abortado e, se infectadas antes da procriação, frequentemente não abortam (ACHA & SZYFRES, 2005; CORBEL, 2006; ROBINSON, 2003b). Os trofoblastos são consideradas a célula alvo primária para invasão e multiplicação de *B. abortus* na placenta (XAVIER et al., 2009). O aborto devido a *B. abortus* depende da gravidade e distribuição de lesões carunculares, que causam privação

fetal de oxigênio e nutrientes (LOPEZ et al., 1984; XAVIER et al., 2009). Frequentemente, as placentas ficam retidas e ocorre a diminuição da produção de leite, as gestações subsequentes são normais, após um período de esterilidade temporária. Apenas 5% das fêmeas abortadas apresentam esterilidade residual (XAVIER et al., 2009). A maioria das vacas eliminará os organismos no leite e nas secreções uterinas após a infecção (ACHA & SZYFRES, 2005; CORBEL, 2006; ROBINSON, 2003b). Por enquanto a maior chance da brucelose se espalhar num rebanho ocorre no momento do aborto ou parto de um animal infectado e, como medida de prevenção, o animal deve ser isolado por pelo menos quatro dias, de preferência até cessar todas as descargas infecciosas (CORBEL, 2006; XAVIER et al., 2009).

A infecção fetal resulta da aspiração de líquido amniótico contendo *B. abortus*, um processo exacerbado pela anoxia secundária a placentite. Após invasão através trato respiratório, pode ocorrer bacteremia e alastramento da bactéria no organismo para outros órgãos (LOPEZ et al., 1984). A infecção latente pode se desenvolver em alguns bezerros expostos a *B. abortus* no útero ou no início da vida dos bezerros que ingeriram colostro ou leite infectado, que pode ser ejetado intermitentemente do úbere por vários meses após o parto (BERCOVICH, 1998;. CORBEL, 2006; ROBINSON, 2003b). Esses bezerros constituem um risco para os rebanhos livres de bruceloses, se forem utilizados para substituir o melhoramento genético (BERCOVICH, 1998; POESTER et al., 2013).

Os bezerros infectados podem contaminar pastagens por até um mês após serem desmamados da fonte de leite infectado, passando o microrganismo pelas fezes e contaminando o meio ambiente (AKHTAR & MIRZA, 1995; FAO/WHO/OIE, 2001). Estudos registraram taxa relativas de soroconversão na progênie de fêmeas soropositivas entre 10 - 26.4%, e varia, dependendo das boas práticas de manejo na pecuária (AKHTAR & MIRZA, 1995; ROBINSON, 2003a). Bezerros de fêmeas infectadas devem ser abatidas e todos os outros devem ser alimentados com leite de vacas sem a bactéria, para evitar infecção cruzada (AKHTAR & MIRZA, 1995).

As novilhas podem não reagir sorologicamente ao antígeno *Brucella* spp. até a primeira gravidez ou não apresentar sinais de brucelose por anos. As novilhas têm pouca vigilância devido as restrições da idade para as provas sorológicas em países que tem vacinação. Fêmeas vacinadas quando pequenas não devem ser testadas até os 24 meses porque podem apresentar títulos vacinais (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a).

1.7. Papel do macho

Em touros, as *Brucella* spp. podem ficar localizadas nos testículos e órgãos genitais adjacentes, e causar epididimite e orquite. Quando a doença clínica é evidente, um ou ambos os testículos podem aumentar de tamanho, com diminuição da libido e infertilidade. Às vezes, um testículo pode atrofiar devido a aderências e fibrose. A vesiculite seminal e a ampulite são comuns. Ocasionalmente, higromas e artrite são observados em bovinos (ACHA & SZYFRES, 2005).

A importância da transmissão venérea varia de acordo com a espécie do gênero *Brucella*. Esta via é a principal forma de transmissão de *B. ovis*, *B. suis* e *B. canis*, sendo também uma rota para *B. abortus* e *B. melitensis* (CORBEL, 2006). Touros podem permanecer funcionalmente fértil, mas com derramamento de organismos de *Brucella* spp. através do sêmen durante a fase aguda da doença (CORBEL, 2006). O derramamento, no entanto, pode cessar ou se tornar intermitente na fase crônica. Antigamente pensava-se que a disseminação da brucelose dependia no modo como um touro infectado era utilizado e, poderia não espalhar a infecção porque o sêmen não foi depositado no útero, e o pH da vagina poderia impedir a sobrevivência da bactéria (BERCOVICH, 1998). Mas essa suposição foi revalidada. A transmissão sexual pelo uso do touro ou o uso da inseminação artificial geralmente desempenha pouco papel na epidemiologia da bruceloses, mas podem sim transmitir a doença e ser fonte de infecção para um rebanho livre, porém os touros devem ser testados como livre de infecção (BERCOVICH, 1998; CORBEL, 2006).

De acordo com as recomendações do código terrestre OIE para as importações de sêmen, deve-se ter um certificado veterinário internacional que demonstre que os animais coletados: 1) não manifestaram sintomas de infecção por *Brucella* spp. no dia da coleta do sêmen; 2) não estão vacinados contra *Brucella* spp; 3) permaneceram num rebanho livres de infecção por *Brucella* spp. e 4) tiveram resultado negativo nas provas sorológicas feitas cada seis meses (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL, 2019).

1.8. Hospedeiros Erráticos ou Reservatórios?

A infecção de hospedeiros inespecíficos amplia a gama de hospedeiros de *Brucella* spp. e desempenha um papel significativo na sua distribuição global (WARETH et al., 2020). Por exemplo, uma certa importância na epizootia e epidemia da brucelose pode ser atribuída à animais sinantrópicos e selvagens exoantrópicos que habitam instalações do gado, fazendas ou pastagens, tais como cães, búfalos, hares, ratos, raposas, arminhos, lemingues, passarinhos e peixes. Eles podem ser infectados devido ao contato próximo enquanto moram na mesma

área ou pode ser indicativo de uma alta contaminação na natureza. (ZHELUDKOV & TSIRELSON, 2010).

Os seres humanos também podem ser infectados por contato direto ou consumo de tecidos de espécies não ruminantes infectadas (EL-TRAS et al., 2010). Já foram encontrados peixes gato infectados com *B. melitensis* bv 3, em pequenos afluentes dos canais do Nilo na região do Delta do Nilo (EL-TRAS et al., 2010). Especula-se que o descarte de resíduos de animais (carcaças, leite, material abortado e parto) no Nilo desempenha um papel importante na transmissão de *Brucella* spp. e é a razão da alta incidência nessas regiões. Assim mesmo *B. melitensis* bv 3 foi isolado de ratos, sendo este um fato interessante que deve ser investigado mais adiante no futuro.

Existem muitos fatores de risco envolvidos na brucelose. Entre esses fatores, os ectoparasitas, particularmente os carrapatos, são vetores importantes que não receberam muito atenção dos epidemiologistas que investigaram a doença (SALEEM, 2019). Experimentos mostraram que alguns *Ixodídeos* e carrapatos *Argasídeos* podem ser infectados com *Brucella* em qualquer fase do seu desenvolvimento, podendo transmitir o patógeno para os animais durante a sugação de sangue (IQBAL, 1997). O papel dos carrapatos como vetores ou reservatórios de *Brucella* spp. foi especulado e a suscetibilidade de carrapatos a bactéria foi comprovada, sendo detectada a infecção pelas espécies *B. abortus* em *Hyalomma marginatum* e *Dermacentor nuttali* parasitando o gado em Moscou (PRITULIN, 1954). Da mesma forma, *Brucella* spp. foi isolado de *Dermacentor marginatus* e *Dermacentor pictus* (GUDOSHNIK, 1958) e sua transmissão foi observada de forma transovariana e translavaria em *D. marginatus*, (WANG et al., 2018). Os membros do gênero *Boophilus* também podem atuar como vetores de brucelose na natureza (HOSSEINI-CHEGENI et al., 2017). Estes fatos fornecem evidências de que os artrópodes parasitos podem ser considerados possíveis reservatórios de infecção por brucelose, mas ainda são necessários mais estudos para confirmar o real papel dos carrapatos como vetor ou reservatórios de espécies específicas de *Brucella* (HOSSEINI-CHEGENI et al., 2017).

Em mamíferos marinhos, os parasitos pulmonares também devem ser considerados como um meio potencial de transferência de infecção de *Brucella* spp. Alguns resultados de pesquisas tem demonstrado a transmissão de brucelose a pinípedes por nematódeos pulmonares do gênero *Parafilaroides* infectados (DAWSON et al., 2008; GARNER et al., 1997). Destacasse as implicações zoonóticas para humanos expostos a mamíferos marinhos por meio de ocupação, alimentação ou ócio (DAWSON et al., 2008).

Anticorpos anti-*Brucella* já foram detectados em diferentes espécies de aves usando ferramentas de diagnóstico sorológicas clássicas. A infecção experimental de embriões de galinha induziu a doença e resultou no desenvolvimento de lesões específicas. No entanto, o isolamento de *Brucella* spp. de aves infectadas naturalmente ainda não foi possível (ONUNKWO et al., 2018; WARETH et al., 2015^a; WARETH ET AL., 2020).

Há uma necessidade urgente de um programa de monitoramento e controle contra a brucelose nestas áreas de estudo, usando uma abordagem coordenada de “Saúde Única”, levando em consideração as consequências econômicas e de saúde pública em relação a brucelose em hospedeiros inespecíficos.

1.9. Medidas de prevenção na pecuária

Poucos estudos têm calculado a taxa de transmissão do agente etiológico da brucelose no gado. De acordo com modelos epidemiológicos, numa região de gado leiteiro na China, a taxa de transmissão (R_0) da brucelose, foi calculado em $R_0 = 1.19$ para o período entre 1987 e 1998 e um $R_0 = 2.1$ para o período entre 1998 e 2005., o que reflexa o incremento da velocidade de transmissão ao longo dos anos. As medidas de descarte são as mais sensíveis em termos de R_0 , além do impacto da limpeza e desinfecção da fazenda, embora dependa do número total de bactérias emitidas no ambiente. O estoque permanente do gado sem repovoamento também é uma boa medida, já que a introdução de gado novo põe em risco de introdução e transmissão da doença. Segundo este modelo, quando são combinados descarte de animais, limpeza e desinfecção e controle da introdução de novos animais se chega a uma forma eficiente de controle da doença (NIE et al., 2014).

1.10. Vacinação para bruceloses bovina

As vacinas da cepa lisa (S) B19 e da cepa áspera (R) RB51 são utilizadas na pecuária como uma ferramenta de controle epidemiológico e prevenção da zoonose. (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). No entanto, ainda não tem sido desenhada a vacina perfeita e as duas vacinas têm vantagens e desvantagens: A cepa vacinal B19 é a mais usada nos programas de controle em vários países e é a única usada com sucesso na erradicação da brucelose nos países livres (MORIYÓN et al., 2004). Mas as vacinas vivas modificadas de *B. abortus* (RB51) são altamente eficazes na redução das perdas na produção, causadas pela brucelose, visto que o aborto é a chave para a transmissão da brucelose em bovinos, uma vacina que possa prevenir o aborto com eficácia é capaz de reduzir a transmissão da doença e reduzir em grande parte as perdas econômicas causadas pela doença (DORNELES et al., 2015)

Como desvantagens a cepa RB51 é resistente à rifampicina, um antibiótico usado no tratamento da brucelose humana, as cepas B19 e RB51 são virulentas para humanos e em alguns casos, podem eliminar as cepas da vacina pelo leite (COSSABOOM et al., 2018; MIRANDA et al., 2016). Finalmente, alguns anticorpos produzidos por bovinos vacinados podem ser detectados em testes sorológicos e dar um resultado falso positivo (NATIONAL COUNCIL OF STATE LEGISLATURES, 2018; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

Na Colômbia adotou as duas vacinas B19 e RB51 para a imunização contra a brucelose de fêmeas entre três e nove meses de idade. Animais vacinados nesta faixa etária com cepa RB51 precisaram de reforço entre 9 e 15 meses de idade, realizado exclusivamente com a cepa RB51. Animais vacinados com cepa B19 não precisaram do reforço. Nenhuma dessas vacinas pode ser usada para a vacinação de machos (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a).

1.10.1. Cepa vacinal B19

A cepa mais comumente usada para vacinar gado é *B. abortus* B19, uma cepa espontânea atenuada descoberta por Dr. Jhon Buck em 1923. Foi originalmente isolado do leite de um animal infectado com uma cepa virulenta, mas foi atenuada por uma mutação espontânea e desconhecida durante sua cultura no laboratório. Ainda são desconhecidos os mecanismos moleculares e celulares que ocasionam a perda de virulência (CRASTA et al., 2008). Um estudo recente identificou mutações em 24 genes de *B. abortus* B19 em relação a *B. abortus* cepa de campo que podem explicar sua perda de virulência. Entre esses 24 genes, algumas proteínas codificadas envolvidas no metabolismo do eritritol e lipídico (HAAG et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2012).

A cepa B19 é uma cepa lisa, e expressa o antígeno O do LPS que confere imunidade de longa duração. Apesar de ser atenuada, é sorologicamente indistinguível das cepas virulentas e induzem anticorpos contra O-PS duráveis, que podem ser difíceis de distinguir daqueles resultantes de infecção e podem produzir um resultado sorológico falso-positivo e, portanto, podem complicar o diagnóstico, quando aplicada fora da faixa etária preconizada ou em animais testados antes dos 24 meses de idade (BECKETT & MACDIARMID, 1985; NIELSEN, 2002; PADILLA POESTER et al., 2010). Antes do desenvolvimento dos ensaios de ligação primária, a distinção sorológica da cepa B19 não era fácil. Isso levou a inúmeros dilemas de diagnóstico e a quarentena ou sacrifício de muitos animais não infectados. Esses problemas foram amplamente superados com o desenvolvimento de imunoenaios

enzimáticos competitivos (cELISA) e um ensaio de polarização de fluorescência (FPA), que eliminou quase todos os anticorpos vacinais residuais (GALL & NIELSEN, 2004; NIELSEN, 2002, 2000).

Atualmente existe no mercado uma vacina B19 ocular, que garante segurança e suficiência, que pode ser usado com sucesso no teste e programas de erradicação baseados no abate, quando aplicado em novilhas jovens de reposição e em vacas adultas, como ferramenta profilática para controlar a doença em áreas endêmicas e combinadas com métodos de diagnóstico adequados (“PREVENTING WITH EXPERTS DISEASES SUCH AS BRUCELLOSIS FOR A HEALTHIER WORLD,” N.D.).

A eficácia das vacinas e a produção de anticorpos com a cepa B19, depende amplamente da idade do animal no momento da vacinação, da dose e da via em que a vacina é administrada, além da prevalência de brucelose no rebanho. Segundo alguns estudos, após a vacinação o animal ficará protegido contra a brucelose por vários anos, podendo se estender até o quinto parto da fêmea (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Em geral, após a vacinação do bezerro, antígenos de B19 não persistem no trato reprodutivo de novilhas maduras e não causa aborto nesses animais (DORNELES et al., 2015).

B. abortus cepa B19 são virulentos para humanos e não é completamente avirulento para vacas gerando abortos em uma pequena porcentagem (<2,5%) de vacas imunizadas e orquite em touros. As cepas vacinais de *B. abortus* B19 também foram associadas à artropatia, quando complexos imunes contendo o antígeno B19 foram encontrados nas articulações de bovinos livres de brucelose, mas vacinados (World Organization for Animal Health, 2018).

1.10.2. Cepa vacinal RB51

A cepa RB51 é um mutante rugoso espontâneo derivado da cepa lisa e virulenta de *B. abortus* 2308, após uma série de passagens em meios seletivos contendo doses sub-inibitórias de rifampicina e penicilina (MIRANDA et al., 2016; SAMARTINO et al., 2000; SCHURIG et al., 1991).

Em animais foi observado que esta cepa pode causar placentite, endometrite e infecção fetal em fêmeas vacinadas durante o período de gravidez. No gado vacinado pode ocorrer, em alguns casos, ejeção da cepa da vacina pelo leite (COSSABOOM et al., 2018; DADAR et al., 2019). Os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da incidência de aborto (SCHURIG et al., 1991), mas sua rápida eliminação pode resultar em estimulação antigênica insuficiente (MORIYÓN et al., 2004). A cepa vacinal

RB51 também exibe perda de virulência e não pode se replicar dentro dos macrófagos (SCHURIG et al., 1991)

Projetada para não interferir no sorodiagnóstico, há uma opinião forte de que os anticorpos não desempenham um papel na sorologia de animais vacinados com cepas rugosas, já que estas cepas RB51 não contém O-PS em sua superfície celular, embora agora se conhecesse, possuem quantidades mínimas de O-PS que podem detectar-se (SCHURIG et al., 1991), mas ainda faltam dados experimentais bem definidos a esse respeito (MORIYÓN et al., 2004). Estudos já demonstraram interferência da vacina RB51 no ensaio de imunocromatografia e no ELISA indireto de imunoglobulina G (iELISA), mas não no teste Rosa Bengala (RBT) (GUSI et al., 2019; POESTER et al., 2000).

A cepa RB51 está sendo cada vez mais utilizada em relação a B19 em alguns países, mas sua eficácia é controversa (SCHURIG et al., 1991). Alguns experimentos encontraram boa proteção em bovinos adultos vacinados e um melhor desempenho para proteção de bezerro em relação a B19. Experimentos controlados em bezerros, entretanto, mostraram que doses reduzidas de RB51 são ineficazes e doses completas apenas parcialmente eficazes em relação a B19 contra desafios severos. Além disso, outras observações sugerem que RB51 é ineficaz quando existe uma alta prevalência da doença (MORIYÓN et al., 2004).

1.10.3. Reversão para virulência

As vacinas *B. abortus* da cepa B19, preparadas a partir do estoque de cepas de fontes apropriadas, são estáveis em características e não demonstram tendência a reversão para virulência, desde que sejam cumpridos os requisitos de controle do processo de produção (DORNELES & TEIXEIRA, 2018). Assim mesmo, as vacinas *B. abortus* RB51 não demonstrarem tendência reverter-se em organismos lisos virulentos após muitas passagens *in vitro* e *in vivo*. Provavelmente, isso se deve à natureza e ao local das mutações encontradas nessa cepa. Mas a cepa RB51, ainda tem mutações desconhecidas devido a um gene *wboA* (gene putativo da glicosil-transferase) que carrega uma inserção *IS711* que acumula baixas quantidades de O-PS e precisam ser melhormente estudadas. Embora o RB51 mostrou ser um mutante rugoso estável, mesmo após múltiplas passagens por culturas de laboratório e animais infectados gado (SCHURIG et al., 1991).

1.11. *Brucella* spp. como agente bioterrorista

A *Brucella* spp. tornou-se um bom agente para armas biológicas pela sua relativa estabilidade no aerossol, combinada com a baixa dose infecciosa (GREENFIELD et al., 2002; PAPPAS et al., 2006). Este patógeno foi objeto de extensas pesquisas no passado e ainda

pertence à categoria de patógenos B na maioria das listas. Sua propensão para transmissão aérea e indução de doenças crônicas debilitantes que requerem esquemas de antibióticos combinados para tratamento, sua prevalência em todo o mundo e suas inespecíficas características clínicas que desafiam o diagnóstico clínico rápido são algumas das características que se aplicam às armas de patógeno potencial. No entanto, a mortalidade mínima, disponibilidade de opções de tratamento, período prolongado de inoculação e o surgimento de novas armas potenciais mais virulentas significa que sua inclusão entre os agentes de bioterrorismo é hoje em dia de significado histórico (PAPPAS et al., 2006).

O trabalho científico necessário para compreender a virulência e a evolução natural, assim como as relações taxonômicas do gênero *Brucella*, se confronta com a ameaça de ser consideradas agentes Bioterroristas. Por tanto, as pesquisas de *Brucella* spp. vem enfrentando um grande problema de carga reguladora restritiva que ameaça a investigação e tem o potencial de prevenir o progresso científico (FICHT, 2010).

1.12. Epidemiologia da Bruceloses em Humanos

Recentemente, as espécies do gênero *Brucella* foram designadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como agentes zoonóticos negligenciados, definidos como entidades de doenças com a probabilidade de afetar uma população com poucos recursos, com um perfil político subdesenvolvido e um investimento correspondentemente limitado por governos e comunidades (MABLESON ET AL., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION & PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). A verdadeira incidência de brucelose humana é desconhecida podendo variar de $< 0,01$ a > 200 por 100.000 habitantes (VILLALOBOS-ZÚÑIGA et al., 2011). Na América Latina, países endêmicos como Peru tem incidência muito alta de infecções, mas outros países relatam baixa incidência de bruceloses humana, podendo estar associado aos baixos níveis de vigilância (CORBEL, 1997).

Atualmente, não existem vacinas que possam prevenir a brucelose em humanos, por tanto, somente o controle da brucelose em animais reduz drasticamente a incidência da doença em humana (RAHMAN et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION AND PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). Os programas de controle e erradicação da brucelose no mundo encontram-se baseados na realização de testes sorológicos, eliminação de animais positivos e vacinação, para atingir a diminuição dos casos nos humanos (ROTH et al., 2003).

O aumento da prevalência de brucelose em reservatórios de animais cria um alto risco de transmissão em humanos (MORENO, 2014). As pessoas podem se tornar hospedeiras acidentais de *Brucella* spp. pelo consumo de alimentos de origem animal sem processos adequados de cozimento e pasteurização (NEGRÓN et al., 2019). A brucelose é uma doença ocupacional que pode ser transmitida por contato direto com secreções de animais infectados, inoculação acidental durante programas de vacinação ou por transmissão aérea ao vacinador, veterinários, laboratoristas, trabalhadores de matadouro e trabalhadores de campo (HATCHER et al., 2018; PEREIRA et al., 2020; TRAXLER et al., 2013). Recentemente foi relatado um surto de brucelose na China, onde o pessoal de laboratório adquiriu a doença por inalação e, além disso, a bactéria escapou do laboratório e contaminou moradores próximos (ZHANG et al., 2020). Portanto, erradicar a doença tornou-se uma das principais metas dos programas de saúde pública em países endêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION & PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A transmissão para humanos ocorre através de pele exposta a secreções de animais, aerossóis infectados, inoculação no saco conjuntival ou ingestão de laticínios não pasteurizados, principalmente leite e seus derivados. Os produtos à base de carne são menos frequentemente associados à infecção, porque geralmente não são consumidos crus. A carne geralmente contém baixas concentrações de organismos de *Brucella* spp, mas o fígado, rins, baço, úbere e testículos podem conter concentrações muito mais altas. Pratos consumidos crus ou malcozidos apresentam um perigo potencial (CORBEL, 2006). A brucelose adquirida de uma fonte de alimento contaminada pode afetar simultaneamente vários membros da família no mesmo tempo (GREENFIELD et al., 2002; NOVIELLO et al., 2004). As cepas de vacinas animais (cepa B19 e cepa RB51) também podem causar doença após inoculação acidental (HATCHER et al., 2018) ou pela excreção destas vacinas através da leite após vacinação (COSSABOOM et al., 2018; DADAR et al., 2019; NEGRÓN et al., 2019).

Uma retrospectiva de 151 prontuários médicos eletrônicos relacionados com bruceloses humana em três grandes centros hospitalários de Estados Unidos, entre 1º de janeiro, 2007 e 1 de junho de 2017 (Parkland Health e Hospital System, Clements University Hospital e Children's Medical Center), concluiu que os principais fatores de risco de bruceloses humana estão associados ao consumo de queijo não pasteurizado em 71% dos casos, à viagens internacionais recentes em 54% dos casos, ao contato próximo com membros da família com brucelose em 36% dos casos, a nenhum fator de risco identificável em 18% dos casos e a exposição dos animais em 11% dos casos, um deles relacionado infecção por *Brucella canis*,

relatado de um cuidador de um cão que apresentou abortos espontâneos (HASSOUNEH et al., 2019).

Na ausência de uma associação direta com uma fonte alimentar ou com mamíferos terrestres, fontes zoonóticas não tradicionais de infecção podem estar envolvidas. O isolamento de novos linhagens de *Brucella* sp., de animais marinhos (EWALT et al., 1994; FOSTER et al., 1996; ROSS et al., 1994), amplia a faixa ecológica do gênero e seu escopo como zoonose (BREW et al., 1999; MCDONALD et al., 2006; SOHN et al., 2003). Existem quatro relatos de humanos infectados com cepas marinhas: um relatório corresponde a uma exposição laboral de um técnico de laboratório que apresentou sintomas consistentes de brucelose enquanto trabalhava com uma cepa marinha (BREW et al., 1999); dois pacientes originários do Peru com brucelose naturalmente adquirida e diagnosticados com neurobrucelose e granulomas intracerebrais, foram confirmados por isolamento, PCR e sequenciamento de DNA (SOHN et al., 2003) e um isolamento de um paciente da Nova Zelândia que identificaram o isolado intimamente relacionado a uma cepa marinha isolada de um golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) e focas comuns (*Phoca vitulina*) (MCDONALD et al., 2006). As cepas de *Brucella* spp. marinhas destacam desafios emergentes para o diagnóstico e tratamento (THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2018; WHATMORE et al., 2008).

A transmissão de pessoa para pessoa é incomum, mas foram relatados casos nos quais evidências sugerem contato pessoal (KATO et al., 2007). A transmissão de maior potencial ocorre através de doação de sangue ou transplante de tecido (CORBEL, 2006). Também foram relatados transmissão pelo consumo de leite materno (ARROYO CARRERA et al., 2006).

Os casos em humanos podem ser um indicador útil da presença da doença em populações animais e podem ser a única fonte de informação para vigilância sanitária. É importante, entretanto, determinar se a infecção foi adquirida localmente ou em outro lugar, já que pode ser considerada uma doença relacionada a viagens a áreas endêmicas (CORBEL, 2006). Assim mesmo, se produtos alimentícios estão implicados, é fundamental estabelecer se estes foram produzidos localmente ou importados (CORBEL, 1997, 2006).

Nas primeiras etapas da infecção os indivíduos apresentam bacteremia com um padrão contínuo, o que faz que a *Brucella* spp. circulantes sejam facilmente detectáveis por hemocultura. Já na corrente sanguínea, o organismo viaja para se alojar em múltiplos sistemas e órgãos, especialmente nos que tem muito retículo endotelial, como o fígado, o baço, os

sistemas esquelético e hematopoiético, onde podem causar doenças localizadas como hepatites e artrites (YAGUPSKY & BARON, 2005). Se não tratada, a brucelose humana crônica pode ser agravada com muitas manifestações patológicas em diferentes órgãos e, eventualmente, pode causar a morte. A brucelose humana pode envolver quase todos os sistemas e órgãos e ser diagnóstico diferencial para uma ampla gama de doenças e síndromes. Por exemplo, a manifestação cutânea ocorre entre o 6-13% dos pacientes com brucelose e inclui erupções cutâneas, pápulas, úlceras, abscesso, eritema, vasculite e paniculite (MILIONIS et al., 2000; MUTNAL et al., 2007; TANYEL et al., 2008). Aproximadamente 10% de dois pacientes com histórico de brucelose apresentam recaídas que ocorrem dentro de um período de um ou dois anos após a terapia antimicrobiana (VRIONI et al., 2008). Inclusive existe um relato de um paciente que apresentou brucelose em área endêmica e retornou ao processo infeccioso após 28 anos (ÖGREDICI et al., 2010).

1.13. Diagnóstico de Bruceloses na pecuária

O diagnóstico confiável da brucelose na pecuária é uma etapa fundamental para a avaliação do quadro epidemiológico e a implementação de medidas de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION & PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). Ao mesmo tempo, o diagnóstico adequado pode ajudar a mitigar o impacto econômico gerado pelo abate de animais infectados, os custos adicionais para recuperar um status livre de brucelose, bem como o impacto socioeconômico no desenvolvimento rural (TROTTA et al., 2020).

O diagnóstico de infecções por *Brucella* spp. pode ser feito por cultura, testes sorológicos e métodos moleculares (YAGUPSKY, 2015; YAGUPSKY et al., 2020). O “padrão ouro” para um diagnóstico definitivo das infecções é a cultura de *Brucella* sp. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL, 2018). No entanto, os testes bacteriológicos só podem ser feitos em laboratórios de nível de biossegurança 3 (GREENFIELD et al., 2002; SMIRNOVA et al., 2013). Segundo a OIE, nas situações em que o exame bacteriológico não é praticável, o diagnóstico deve ser baseado em métodos imunológicos ou moleculares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL, 2018). Mas as provas moleculares ainda encontram-se em validação, portanto, os testes sorológicos são mais comumente usados para programas de vigilância e saúde pública (ARIF et al., 2018).

1.13.1. Métodos indiretos: testes sorológicos

A busca persistente por melhores diagnósticos enfatiza a inexistência do teste perfeito (fácil e robusto, acessível e capaz de identificar todos os indivíduos infectados enquanto

diferencia aqueles que não estão infectados, que foram vacinados ou apresentam anticorpos produzidos por bactérias que reagem em reações cruzadas), mas também o fato da brucelose ser uma doença na qual os resultados e a aplicabilidade dos testes diagnósticos serem afetados tanto por questões técnicas quanto por fatores biológicos, epidemiológicos e socioeconômicos complexos. Estes incluem a ausência de sinais clínicos patognomônicos, o comportamento silencioso do patógeno em relação ao sistema imunológico, seu alvo intracelular, uma estrutura antigênica complexa compartilhada por cepas de campo e vacinais, a existência de condições de manejo amplamente diferentes dos animais hospedeiros, as instalações disponíveis para diagnóstico e se os testes são usados para controle e erradicação versus vigilância (DUCROTOY et al., 2016).

O contexto epidemiológico influencia a realização de testes em termos de sensibilidade (*Se*) e especificidade (*Sp*) diagnóstica. O comportamento sigiloso da *Brucella* spp. em relação ao sistema imunológico e seus nichos intracelulares impõe limitações quanto à sensibilidade, nos estágios iniciais ou latentes da infecção (QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997), já que existe um tempo de atraso entre infecção e o desenvolvimento de anticorpos, sendo que suas especificidades também são baixas, variando de 65 a 95%, em áreas onde a brucelose é altamente endêmica (AL DAHOUK et al., 2013; O'GRADY et al., 2016), devido à alta prevalência de anticorpos na população saudável (BAILY et al., 1992; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997). Além disso, as respostas de anticorpos podem não ser detectadas em animais muito velhos ou imunossuprimidos por outras doenças (ARIF et al., 2018).

Quando a situação da brucelose é livre, o valor preditivo positivo (VPP) dos testes se torna muito baixo; as reações sorológicas falso-positivos (FPSR) podem ocorrer devido à infecção por outras bactérias como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O157: H7, que tem O-PS com epítomos compartilhados e são responsáveis pela reatividade cruzada em testes sorológicos que se baseiam na detecção de anticorpos para este antígeno (DORNELES & TEIXEIRA, 2018; DUCROTOY & BARDOSH, 2017; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997).

O O-PS é o antígeno de superfície imunodominante, capaz de induzir uma resposta imune na maioria dos animais em contato com espécies lisas clássicas de *Brucella* spp. Uma vez que os testes são baseados principalmente na detecção de anticorpos contra o O-PS. Algumas cepas rugosas ou atípicas, não pode ser sorotipadas usando os testes comumente utilizados para classificar cepas lisas, podendo comprometer a capacidade de detecção

sorológica de qualquer infecção de *Brucella* spp. por abordagens sorológicas de rotina (WHATMORE et al., 2015; ZYGMUNT et al., 2012).

A detecção de anticorpos no sangue, soro, secreção uterina, mucosa vaginal, leite ou plasma de sêmen de gado suspeito pode ser indicativo de brucelose em um rebanho (CORBEL, 2006). Doenças crônicas como a brucelose podem ou não produzir todos os tipos de anticorpos IgM, IgG1, IgG2 e IgA, direcionados contra *Brucella* spp. em quantidades detectáveis (ARIF et al., 2018). Os anticorpos IgM são produzidos primeiro durante a infecção e os outros anticorpos aparecem mais tarde, embora os tipos IgG1 possam aparecer simultaneamente com anticorpos do tipo IgM (ARIF et al., 2018). A maioria dos anticorpos de reações cruzadas, consiste principalmente em IgM (CORBEL, 1997). Os testes sorológicos que medem IgM não são, portanto, desejáveis, pois resultam em falso-positivos, levando a uma baixa especificidade do ensaio. Uma vez que os anticorpos IgG2 e IgA se acumulam mais tarde após a exposição e geralmente estão presentes em quantidades pequenas e inconsistentes, sendo que o principal tipo de anticorpo para o teste sorológico é o IgG1. Portanto, os ensaios que medem predominantemente IgG1 são os mais úteis (NIELSEN et al., 2004).

Vários testes são usados para detectar brucelose: O teste do anel do leite (MRT), soro teste de aglutinação (SAT), teste de fixação do complemento (CFT), Rosa de bengala (RBT), imunossorvente ligado a enzima indireito (I-ELISA), imunossorvente ligado a enzima competitivo (C-ELISA), teste de ensaio de fluorescência polarizada (FPA), antiglobulina (Coombs), 2-mercaptoetanol e o teste de rivanol são protocolos comumente usados no controle, erradicação ou vigilância da brucelose em todo o mundo (AL DAHOUK & NÖCKLER, 2011; BERCOVICH et al., 1990).

Na colômbia, foi estabelecido o protocolo sorológico em série para o diagnóstico da brucelose em bovinos, começando como um teste RBT ou I-ELISA e dois testes confirmatórios FPA e C-ELISA (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECURIO, 2020a). Os testes usados no programa da prevenção e controle da brucelose bovina na Colômbia, são relatados a continuação.

1.13.1.1. Teste Rosa de Bengala (RBT)

O teste RBT foi introduzido por B. Morgan em 1969. O RBT usa *B. abortus* S99 ou células S1119.3 coradas com Rosa de Bengala, e suspenso em um *buffer* que, quando misturado com o volume apropriado de soro resulta em um pH final de 3,65. O aparecimento de aglutinação deve estar dentro do tempo de teste especificado (4 minutos). Se incubado por

períodos mais longos, as vezes falsas reações ocorrem devido à formação de coágulos de fibrina. São detectados IgM e IgG, baixo uma interpretação por avaliação visual (presença ou ausência de aglutinação) (DUCROTOY & BARDOSH, 2017).

O RBT é o método recomendado para a triagem de amostras para determinar a prevalência do rebanho. É especialmente útil em áreas não endêmica, na qual é realizada como método de triagem pela rapidez e baixo custo (DÍAZ et al., 2011). O valor deste teste varia, no entanto, dependendo essencialmente da fonte de soro (por exemplo, gado vacinado versus gado não vacinado) e o lote do antígeno RBT usado no teste (DÍAZ et al., 2011).

RBT é considerado adequado para bovinos e suínos. No gado em áreas onde ocorre muita vacinação com a cepa B19, os testes da RBT fornecem uma alta proporção de reações falsas positivas. Estes testes são melhores quando utilizados como testes de triagem em larga escala, associado com outro teste. Contudo, em áreas ou rebanhos muito infectados, pode ser mais econômico eliminar todo o gado que deu resultados positivos nos testes, porque muitos desses animais, embora apresentem resultados negativos nos testes de verificação são encontrados em estágios iniciais da infecção e podem disseminar o patógeno (LOPARDO et al., 2017).

Alguns autores relatam que RBT fornece alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de brucelose em ruminantes, mas existem também certas discrepâncias a respeito da sensibilidade. O RBT demonstrou ter alta sensibilidade e especificidade em contextos em que a vacinação não é praticada (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Muitas vezes surge à necessidade de 'confirmar' os resultados da RBT com um teste mais específico, como o cELISA, para populações vacinadas ou em áreas livres ou quase livres de brucelose (DUCROTOY et al., 2016). Nas duas situações, a cELISA pode ser usada para aumentar a valor preditivo do diagnóstico, mas também pode dar "falsos positivos" (DUCROTOY & BARDOSH, 2017).

1.13.1.2. Elisa indireta

Inúmeras variações do iELISA foram descritas para bovinos, pequenos ruminantes e porcos empregando diferentes preparações de antígenos, conjugados antiglobulina-enzima e substrato/cromógenos. *B. abortus* cepa 99 (Weybridge) ou cepa 1119-3 (USDA) que devem ser usadas para a produção desses antígenos, mas *B. melitensis* cepa 16M pode também ser adequado para tal fim. Vários iELISA comerciais utilizam célula inteira, S-LPS ou o O-PS como antígenos. No entanto, a técnica utilizada e a interpretação dos resultados devem ter sido validadas de acordo com os princípios estabelecidos no item 1.1.6 Princípios e métodos

de validação de ensaios de diagnóstico para doenças infecciosas (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

Os iELISA que usam S-LPS ou O-PS como antígenos são altamente sensíveis para a detecção de anticorpos anti-*Brucella* em bovinos, pequenos ruminantes e porcos, mas não são capazes de resolver totalmente o problema de diferenciação entre anticorpos resultantes da cepa vacinal B19. A vacina RB51 também pode interferir em iELISA baseados em S-LPS. A maioria dos FPSR são resultado de reação cruzada com a porção O-PS da molécula S-LPS. As reações positivas devem ser investigadas usando uma confirmação adequada (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

1.13.1.3. Ensaio de polarização de fluorescência

A base do teste consiste em uma molécula em solução, que gira aleatoriamente a uma taxa inversamente proporcional ao seu tamanho. Se a molécula for marcada com um marcador fluorescente e examinada por luz plana polarizada, uma pequena molécula girará em um determinado ângulo mais rápido do que uma molécula maior. O tempo de rotação pode ser medido usando medições horizontais e verticais. Para o diagnóstico de brucelose, um analisador de polarização de fluorescência é usado para obter uma medição de fundo da fluorescência do soro diluído. O antígeno consistindo num fragmento O-PS, com aproximadamente 22 kDa de tamanho, marcado com isotiocianato de fluoresceína, é adicionado e incubado por 2 minutos, seguido por uma leitura final no analisador que subtrai automaticamente a leitura de fundo. O resultado é apresentado em unidades de milipolarização. O teste é robusto, relativamente barato, simples e muito rápido. O FPA foi validado para um grande número de espécies, incluindo gado, suínos, bisões e uma série de cervídeos, sendo um teste alternativo para diagnóstico de brucelose bovina e suína (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018)

1.13.1.4. Elisa Competitiva

Diversas variações do cELISA, usando S-LPS ou O-PS como antígenos, foram descritas para bovinos, pequenos ruminantes e porcos empregando diferentes conjugados antiglobulina-enzima, substrato ou cromógenos e antígenos preparados a partir de diferentes cepas lisas de *Brucella* spp. No entanto, a técnica utilizada e a interpretação dos resultados devem ter sido validadas de acordo com os princípios estabelecidos no capítulo 1.1.6. “Princípios e métodos de validação de ensaios de diagnóstico para doenças infecciosas” (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

cELISA elimina alguns, mas não todos os FPSR causados por bactérias com reação cruzada em bovinos. O teste reduz, mas não elimina totalmente as reações causada por anticorpos produzidos em resposta à vacinação (MUÑOZ ET AL., 2012; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Grande parte da melhoria da especificidade ocorre devido a uma redução na sensibilidade do cELISA em comparação com RBT ou iELISA (DORNELES et al., 2014). Portanto, reações cELISA positivas devem ser investigadas usando estratégias confirmatórias ou complementares adequadas. Vários testes comerciais estão disponíveis. Alguns protocolos são menos sensíveis ou menos específicos do que outros, portanto os resultados obtidos em diferentes ensaios nem sempre são comparáveis (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

1.13.2. Métodos Direitos: Cultura

O padrão ouro no diagnóstico da brucelose é o cultivo, isolamento e tipificação do microrganismo (OLSEN et al., 2018). Mas a bactéria é exigente para o seu crescimento, afetando a sensibilidade, que não excede os 50% (AL DAHOUK et al., 2013; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997). As espécies e biovars foram classicamente reconhecidas por diferenças fenotípicas, de acordo com as características de seus isolados, como requerimento de CO₂, produções de H₂S, sensibilidade a tinções e fagos, e outros fatores metabólicos e antigénicos (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). No entanto, *Brucella* spp. é uma bactéria exigente que, na maioria das espécies, requer incubações prolongadas, apresentando também um alto risco de infecção para o pessoal do laboratório (YAGUPSKY et al., 2020).

A cultura bacteriana e os testes sorológicos continuam sendo as principais ferramentas para o diagnóstico da brucelose, desempenhando papel fundamental nos programas de prevenção, controle e erradicação. No entanto, nenhum desses testes em separado tem a validade necessária ou capacidade preditiva (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

1.13.3. Métodos Direitos: PCR

As técnicas moleculares contribuem para a identificação de espécies e biovars de isolados de *Brucella* spp. (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). As melhorias tecnológicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) levaram a uma detecção mais precisa e simples de *Brucella* spp., a partir de amostras clínicas como soro, sangue total, leite e secreção vaginal em vez de isolados bacterianos (SELIM et al., 2019; SMIRNOVA et al., 2013).

Diferentes regiões gênicas de *Brucella* spp., incluindo o gene que codifica para a proteína BCSP31, o gene ribossômico *16S*, o gene ribossomal da região espaçadora intergênica *16S-23S* rDNA, o gene que codifica as porinas omp2a e omp2b e o gene que codifica a sequência de inserção *IS711* foram avaliados para a detecção dessa bactéria. Além disso, muitos autores têm utilizado ensaios de PCR para complementar o diagnóstico de brucelose em amostras de sangue humano e animal (BOERI et al., 2018)

No diagnóstico de brucelose humana, diferentes estudos forneceram excelentes resultados com amostras clínicas, como a sangue total, pela amplificação de regiões do gene *bcs31* que codifica uma proteína de membrana imunogênica de 31 kDa (AL-AJLAN et al., 2011; MORATA et al., 1998; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997). O locus *Brucella* spp. contém o gene *bcs31* clonado e sequenciado anteriormente (MAYFIELD et al., 1988) e conservado em todas as espécies do gênero *Brucella* (exceto *B. ovis*), incluindo as cepas vacinais (BRICKER et al., 1988). Quatro anos depois da clonagem, Baily et al. (1992) desenvolveu uma técnica de PCR capaz de amplificar uma região do gene que codifica essa proteína. A técnica mostrou alta sensibilidade, capaz de amplificar 60 fragmentos de DNA em culturas puras de *Brucella* spp. (BAILY et al., 1992). Atualmente, dos testes de PCR para brucelose, descrito por Baily et al. (1992) é um dos mais utilizados e apresenta a maior sensibilidade tanto em cultura pura quanto em amostras clínicas, o tipo de amostra mais utilizado tem sido o sangue seguido pelo soro (AL DAHOUK et al., 2007; MITKA et al., 2007).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) surgiu como um aprimoramento de técnicas moleculares convencionais que, em termos gerais, combinam velocidade, sensibilidade, alta especificidade (quando a sonda é usada), segurança laboratorial e baixo risco de contaminação cruzada ou contaminação de amplicon (AL DAHOUK et al., 2013, 2007). O qPCR pode contribuir para uma detecção mais precisa de *Brucella* spp. de amostras clínicas (SELIM ET AL., 2019; SMIRNOVA et al., 2013). Ensaios de qPCR foram reproduzidos com boa eficiência em alguns estudos para o diagnóstico de brucelose bovina (KARTHIK et al., 2014; MUKHERJEE, 2015; MUKHERJEE et al., 2007; SAREH SAADAT, et al., 2017). No entanto, alguns autores concluem que o sangue total não é uma amostra ideal para o diagnóstico da brucelose bovina devido à presença de inibidores da PCR e à baixa bacteremia durante infecção em gado (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; O'LEARY et al., 2006; TIWARI et al., 2014).

1.14. Situação atual e programa oficial de prevenção e controle da brucelose bovina na Colômbia

Colômbia é um país endêmico para brucelose bovina, e conta com um programa para a prevenção e controle desde 2002. Até hoje, o programa tem lançado treze normativas. A última normativa foi promulgada em 2020 e estabeleceu como medidas de prevenção a vacinação obrigatória, a vacinação estratégica, a certificação de fazendas livres de brucelose e a vigilância ativa de casos e, como medidas de controle, o diagnóstico oficial de brucelose, o controle da mobilização de animais, os estudos epidemiológicos complementares e a unidades de segregação controlada (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a).

O diagnóstico oficial da brucelose bovina é feito com soro sanguíneo, através de testes sorológicos: Rosa de Bengala, Elisa Indireto, Fluorescência Polarizada e Elisa competitiva (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a). Os estudos epidemiológicos complementares (ECC) compreendem a realização de uma investigação epidemiológica das fazendas positivas, além da realização de testes complementares como o isolamento bacteriológico e reação em cadeia da polimerase a partir de amostras de animais soropositivos abatidos, mas a identificação e tipificação das espécies circulantes geralmente não é alcançada. As unidades de segregação controlada, são fazendas com animais positivos autorizadas pelo ICA para seu uso produtivo até o abate (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a).

Apesar dos grandes esforços realizados nas medidas de prevenção e controle, e nos programas de erradicação, esta doença ainda não foi controlada e, no norte de Antioquia, um aumento no número de bovinos soropositivos e isolamento do agente etiológico, originaram a promulgação da quarentena pela resolução nº 30392 de 2018 (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2018a).

Os últimos dados oficiais publicados da prevalência na região de norte de Antioquia foram fornecidos no ano 2016, e corresponderam a uma soroprevalência de 3.1% em bovinos e 29% em fazendas (Tabela 1) (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2016). O ICA, no ano 2019 realizou um estudo de soroprevalência de bruceloses que ainda não foram publicados, mas arrojaram uma soroprevalência de 43,7% em fazendas e a partir deste estudo, foi proposto um projeto de resolução, estabelecendo três zonas de prevalência no país: zonas de baixa prevalência $\leq 28\%$, média prevalência $> 28\%$ a $< 39\%$ e alta prevalência de brucelose $\geq 39\%$, ficando Antioquia na zona de alta prevalência (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020b).

Tabela 1. Fazendas e animais soropositivos nos municípios do estudo. Instituto Colombiano Agropecuário. Boletim epidemiológico 2016.

Municipios	Fazendas			Bovinos		
	Amostrados	Positivos	%	Amostrados	Positivos	%
Belmira	61	23	38%	2602	183	7%
Entrerrios	108	36	33%	3206	101	3%
San Pedro de los Milagros	199	56	28%	5486	140	3%
Santa Rosa de Osos	199	67	34%	9383	230	2%
Antioquia	1287	377	29%	38087	1164	3,1%

CAPÍTULO I

Soroepidemiologia da brucelose bovina numa proeminente região leiteira da Colômbia e seu potencial impacto na saúde pública

Este capítulo com algumas pequenas modificações no manuscrito foi publicado em:

HERRÁN RAMIREZ, OL., AZEVEDO SANTOS H, JARAMILLO DELGADO IL, DA COSTA ANGELO I. Seroepidemiology of bovine brucellosis in Colombia's preeminent dairy region, and its potential public health impact. *Braz J Microbiol.* 2020 Dec;51(4):2133-2143. doi: 10.1007/s42770-020-00377-z. Epub 2020 Sep 12. PMID: 32918242; PMCID: PMC7688874.

RESUMO

Foi realizado um estudo transversal para determinar os fatores associados à brucelose em uma das principais regiões leiteira da Colômbia, Antioquia, que foi declarada em situação de quarentena por brucelose bovina. Um questionário epidemiológico voluntário foi aplicado aos proprietários das fazendas, por três entrevistadores com treinamento prévio. Um total de 656 amostras foram coletadas de vacas com dois anos ou mais de idade de 40 rebanhos. As amostras foram selecionadas e analisadas pelos Testes Rosa Bengala (RBT), como triagem, e os testes Fluorescência Polarizada (FPA) e ELISA Competitivo (EC) como testes de confirmação. Uma vaca foi classificada como positiva se a triagem e ambos os testes confirmatórios fossem positivos. O rebanho foi classificado como positivo se em pelo menos uma vaca apresentasse soropositividade. Os fatores associados à soropositividade foram testados por meio de modelo de regressão logística com variáveis explicativas sobre manejo do gado, parâmetros zootécnicos e práticas sanitárias. A soroprevalência no nível animal foi de 6,6 % (43/656) e o nível de rebanho 27,5 % (11/40). No modelo, cinco variáveis explicaram os casos dos animais: compra ou transferência de animais entre as fazendas do proprietário (AOR = 2,79, IC 95 % 1,42 - 5,49), história de aborto (AOR = 4,22, IC 95 % 1,91 - 9,33), nascimento de bezerros fracos (AOR = 13,77, IC 95 % 2,75 - 68,91), uso de um touro para acasalamento (AOR = 9,69, IC 95 % 2,23 - 42,18), e o vacinação na idade adulta (AOR = 3,03, IC 95 % 1,04 - 8,78). No modelo em nível de rebanho, duas variáveis explicaram os casos: nascimento de bezerros fracos (AOR = 9,60, IC 95 % 1,54 - 59,76) e compra ou transferência de animais entre as fazendas do proprietário (AOR = 7,22, IC 95% 1,03 - 50,62). Esses resultados justificam a necessidade da declaração de quarentena na região e a realização de estudos epidemiológicos que permitam atualizar a prevalência, gerar recomendações locais sobre práticas que precisam ser implementadas e contribuir a interromper a transmissão, como medida de saúde pública utilizada para combater o surto.

Palavras-chaves: *Brucelose, surto, epidemiologia*

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted to determine the associated factors of brucellosis in Colombia's preeminent dairy region declared in quarantine. A voluntary epidemiological questionnaire was applied to farm owners by three interviewers with previous training. A total of 656 samples were collected from cows ≥ 2 -year-old from 40 herds. Samples were screened by the Rose Bengal Plate Test, and the Fluorescence Polarized Assay test and Competitive ELISA were used as confirmatory tests. A cow was classified as positive if the screening and both confirmatory tests were positive. A herd was classified as positive if at least one cow was seropositive. The factors associated to seropositivity were tested using a logistic regression model with explanatory variables regarding cattle management, zootechnical parameters, and sanitary practices. The seroprevalence at the animal level was 6.6 % (43/656) and at herd level 27.5 % (11/40). In the model, five variables explained the animal cases: purchase or animal transfer between owner's farms (AOR = 2.79, 95 % CI 1.42 - 5.49), history of abortion (AOR = 4.22, 95 % CI 1.91 - 9.33), birth of weak calves (AOR = 13.77, 95 % CI 2.75 - 68.91), use of a bull for mating (AOR = 9.69, 95 % CI 2.23 - 42.18), and the vaccination in adulthood (AOR = 3.03, 95 % CI 1.04 - 8.78). In the model at the herd level, two variables explained the cases: birth of weak calves (AOR = 9.60, 95 % CI 1.54 - 59.76) and purchase or animal transfer between owner's farms (AOR = 7.22, 95 % CI 1.03 - 50.62). These results justify the need for a quarantine declaration in the region and carry out epidemiological studies to update the prevalence, generate local recommendations on practices that need to be implemented, and contribute to interrupting transmission, as a public health measure used to combat the outbreak.

Keywords *Brucellosis, outbreak, epidemiology*

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença zoonótica negligenciada causada pela bactéria *Brucella* spp. que causa uma doença grave, crônica e debilitante em humanos. As pessoas podem se tornar hospedeiras acidentais de *Brucella* spp. pelo consumo de alimentos de origem animal sem processos adequados de cozimento e pasteurização (NEGRÓN et al., 2019). A brucelose também é uma doença ocupacional, que pode ser transmitida por contato direto com secreções de animais infectados, inoculação acidental durante programas de vacinação, ou por transmissão aérea à pessoas que atuam como vacinadores, veterinários, laboratoriais, pessoal de matadouro e produtores da pecuária (WORLD HEALTH ORGANIZATION AND PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Uma vez que a que prevalência de brucelose em animais se encontra diretamente relacionados com a apresentação de casos humanos (ACHA & SZYFRES, 2005), o controle e erradicação da doença na produção animal tornou-se uma das principais metas dos programas de saúde pública em países endêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION & PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016).

B. abortus é apontada como responsável por mais de 80% dos casos de brucelose bovina, sendo o boi seu hospedeiro primário. A brucelose bovina é encontrada em todo o mundo, causando perdas de produção com impacto financeiro significativo para os agricultores (SAMARTINO & EDDI, 2010). Os principais fatores de risco para a introdução e disseminação da brucelose na pecuária estão diretamente relacionados à falta de biossegurança e práticas de manejo apropriadas (RHYAN et al., 2013).

A brucelose é geralmente assintomática em animais jovens e fêmeas não grávidas. Em fêmeas grávidas, o principal sintoma é o aborto. No entanto, mesmo na ausência de um aborto, a bactéria pode se espalhar facilmente para rebanhos de gado por meio de uma excreção profusa de organismos na placenta, fluidos fetais e secreções vaginais (LETESSON et al., 2017). A bactéria pode viver no solo, água, pasto e esterco por muito tempo (KADEN et al., 2018). Por quanto, a excreção da *Brucella* no meio ambiente é um risco à saúde pública das famílias rurais (SAMARTINO & EDDI, 2010).

O controle da doença é feito a partir da vigilância e vacinação dos animais, mas não existem vacinas que possam prevenir a brucelose em humanos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION, 2017). Na pecuária, as vacinas da cepa B19 e da cepa RB51 são usadas como uma ferramenta de controle epidemiológico. No entanto, ambas vacinas têm desvantagens: podem ser virulentas para os humanos, sendo a cepa RB51 resistente à

rifampicina, um antibiótico usado no tratamento da brucelose humana. Em ambas vacinas, o gado vacinado pode, em alguns casos, eliminar a vacina pela leite (NATIONAL COUNCIL OF STATE LEGISLATURES, 2018). Além disso, anticorpos produzidos por bovinos vacinados podem ser detectados em testes sorológicos e dar um resultado falso positivo (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

O diagnóstico de *Brucella* em ruminantes é baseado principalmente em testes bacteriológicos e imunológicos, sendo este último comumente utilizado em programas de controle, erradicação e vigilância. A OIE recomenda os testes sorológicos para desenvolver estratégias preventivas, de controle e erradicação na pecuária de países em desenvolvimento, pela rapidez, facilidade e baixo custo destes testes (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Porém, a cultura e tipificação das colônias isoladas é o “padrão ouro” para um diagnóstico definitivo da *Brucella* spp., mas sua sensibilidade diagnóstica é baixa. A bactéria é considerada um agente bioterrorista e precisa ser trabalhada em laboratórios nível III de biossegurança, com equipes técnicas altamente treinadas para trabalhar com estas bactérias vivas (NIELSEN, 2002; SMIRNOVA ET AL., 2013; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018).

Na Colômbia, a brucelose bovina é considerada uma doença endêmica de controle oficial e de declaração obrigatória desde 2002 (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a.; ORTIZ, 2015)). Apesar dos poucos estudos realizados desta doença na Colômbia, ela foi diagnosticada pela primeira vez em 1924 e isolada em 1927 no Instituto Samper Martinez (VALENCIA & GUZMAN, 1987). No país, já foram isoladas as espécies *B. abortus* (biovars 1, 2 e 4) (LUCERO et al., 2008; PACHECO-MONTEALEGRE et al., 2017), *B. canis* (ORTIZ et al., 2012), *B. suis* (biovar 1) (PÉREZ FRANCO, 1972; VALENCIA & GUZMAN, 1987) e *B. melitensis* (MONDRAGÓN-LENIS et al., 2020). Ínterim, os dados oficiais reconhecem no país apenas a espécie *B. abortus* (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2016).

A Colômbia tem quatro regiões que impulsionam a produção nacional de leite: Antioquia, Cundinamarca, Boyacá e Nariño. Antioquia é líder na produção de leite, implementação de boas práticas pecuárias (BPG) e os regulamentos de exportação de leite para os Estados Unidos Pasteurized Milk Ordinance (PMO). Inúmeras foram as tecnologias implementadas para competitividade da produção e avanço nos programas de saúde para rebanhos livres de brucelose e tuberculose neste departamento. Infelizmente, rebanhos considerados livres da brucelose anteriormente mudaram para rebanhos positivos. Isso tornou

necessária a declaração de quarentena para brucelose e a implementação de medidas sanitárias para o controle da doença na região (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2018^a, 2019). A situação poderia evidenciar a falta de planos de controle eficazes para evitar a introdução e transmissão da doença.

A importância da pecuária para o desenvolvimento econômico e social, assim como para a segurança alimentar, justifica desenvolver estudos epidemiológicos de brucelose bovina para atualizar a prevalência, gerar recomendações locais sobre práticas que precisam ser implementadas e contribuir a interromper a transmissão; com o fim de proteger a saúde humana e alcançar maior produtividade das empresas e famílias rurais. Uma vez que a que prevalência de brucelose em animais se encontra diretamente relacionados com a apresentação de casos humanos o controle e erradicação na produção animal tornou-se uma das principais metas dos programas de saúde pública.

O presente estudo, têm por objetivo estudar a prevalência da brucelose. bovina numa região leiteira da Colômbia e seus fatores associados ao aumento da soropositividade como um sério problema de saúde pública.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo epidemiológico

Foi realizado um estudo epidemiológico observacional, do tipo transversal, com técnicas quantitativas e um questionário fechado, conduzido por entrevistadores previamente treinados, com informações epidemiológicas para identificar fatores associados a presença de bruceloses bovina na região de estudo.

2.2 Características demográficas da População

A região de estudo localiza-se no Nordeste da Colômbia e possui uma área de 63.612 km², o que representa 5,6% do território país. O norte de Antioquia é composto por 17 municípios e cerca de 31.250 famílias são beneficiadas pela produção de leite, que rende em média 2.500.000 litros por dia, o que representa cerca de 30% da produção anual de leite do país. A população bovina do Norte de Antioquia é distribuída em 11.694 fazendas, com um total de 482.685 animais em 2017 (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2018b) e a produção leiteira especializada fica concentrada nas terras altas do Norte, que tem uma altitude acima de 2000 m. A pecuária leiteira da região possui um sistema intensivo de pastoreio rotativo e suplementação de concentrados e subprodutos de cultivos, que permitem altas cargas de animais por hectare (~4 vacas/ha) (BEDOYA et al., 2018). O estudo foi conduzido nos quatro mais importantes municípios de produção de leite de Antioquia: Santa Rosa de Osos (6°38'50" N, 75°27'38" O), Entrerrios (6°33'55" N, 75°30'51" O), Belmira (6°36' 18" N, 75°39'57" O) e San Pedro de los Milagros (6°27'34" N, 75°33'28" O). Segundo o levantamento da campanha de vacinação contra febre aftosa e bruceloses, no segundo semestre de 2017, o rebanho bovino destes municípios estava estimado em 278,548 cabeças, sendo que 176,799 eram fêmeas maiores de 24 meses, distribuídas em 5,860 fazendas (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2018b) (Tabela 2).

Tabela 2. Faixa etária de bovinos de fazendas provenientes do município de Antioquia relacionada com a campanha de vacinação contra febre aftosa e brucelose no segundo semestre de 2017.

MUNICIPIO	BEZERRAS < 1 AÑO	BEZERROS < 1 AÑO	FÊMEAS 1 - 2 AÑOS	MACHOS 1 - 2 AÑOS	FÊMEAS 2 - 3 AÑOS	MACHOS 2 - 3 AÑOS	FÊMEAS > 3 AÑOS	MACHOS > 3 AÑOS	TOTAL, BOVINOS - 2017	TOTAL, FAZENDAS 2017	TOTAL, FÊMEAS > 24 MESES
BELMIRA	4,947	545	5,611	520	5,198	317	13,946	190	31,274	797	19,144
ENTRERRIOS	7,224	216	7,770	434	4,125	239	29,937	143	50,088	804	34,062
SAN PEDRO DE LOS MILAGROS	11,401	502	12,064	627	8,191	315	39,795	241	73,136	1,840	47,986
SANTA ROSA DE OSOS	18,961	1,773	22,371	2,671	15,327	1,904	60,280	763	124,050	2,419	75,607
TOTAL	42,533	3,036	47,816	4,252	32,841	2,775	143,958	1,337	278,548	5,860	176,799

2.3. População

2.3.1. População origem do estudo

A população de origem eram produtores de gato leiteiro do Norte de Antioquia associados à corporação “Corpogansa do Norte” estimada em 1274 fazendas com um inventário de aproximadamente 38.000 animais.

2.3.2. População alvo

A população alvo foi composta por animais em lactação ou no período seco, com dois ou mais anos de idade, vacinados entre os 3 e 9 meses de idade, com 20×10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) da cepa de vacina lisa B19 ou com $10^{-34} \times 10^9$ CFU da cepa atenuada rugosa RB51 (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a). A vacinação foi verificada pelos registros oficiais de vacinação (RUV).

2.4. Critérios de inclusão e exclusão

2.4.1. Unidades primárias de amostragem (bovinos)

Vacas leiteiras com dois anos ou mais em lactação ou período seco foram as unidades primárias de amostragem.

2.4.2. Unidades secundárias de amostragem (fazendas)

Rebanhos leiteiros em conformidade com programas de vacinação obrigatória contra brucelose e associados da “Corpogansa do Norte”, foram consideradas unidades secundárias de amostragem.

2.5. Delineamento amostral

Amostragem proporcional foi determinada a partir de cada município, para garantir que os municípios com um grande número de gados leiteiros não fossem sub-representados. As fazendas dentro de cada município foram seleccionadas por amostragem aleatória simples, usando uma tabela de números aleatórios sem reposição da base de dados dos produtores associados a “Coorpogansa do Norte”. Os produtores de rebanho foram convidados a participar do estudo e assinaram voluntariamente o acordo de consentimento para formalizar a participação (Anexo A)(Figura4).



Figura 4. Produtor assinando voluntariamente o acordo de consentimento informado para participar. Fazenda a Primavera, San Pedro de los Milagros, Antioquia.

A escolha das fêmeas dentro das fazendas foi feita por amostragem aleatória simples, mediante a utilização de uma tabela de números aleatórios sem reposição, de acordo com a relação do inventário do animal fornecido pelo produtor da fazenda.

O tamanho da amostra foi determinada segundo a fórmula $n = 1,962 p (1 - p)/d^2$ de Thrusfield (2007), assumindo um grau de confiança do 95%, um nível de precisão de 5% e uma prevalência esperada nos animais de 10%, a prevalência foi baseada na literatura e sendo condizente com a capacidade financeira e operacional do estudo (THRUSFIELD, 2007).

O conceito de sensibilidade agregada (Se) e especificidade (Sp) foi usado a fim de determinar pelo menos um animal positivo, com 95% de grau de confiança, a partir do tamanho da amostra (DOHOO et al., 2009; ROBINSON, 2003b). Um total de 15 vacas leiteiras foram amostradas em rebanhos com ≤ 50 vacas, enquanto 22 vacas foram amostradas em rebanhos maiores (> 50 vacas).

2.6. Questionário Epidemiológico

O questionário epidemiológico voluntário foi aplicado aos proprietários das fazendas, associados da “Corpogansa do Norte”, por três entrevistadores técnicos da área pecuária, com doze horas de treinamento prévio antes de iniciar a amostragem, a fim de fortalecê-los no preenchimento do questionário, garantir a confiabilidade na coleta de dados, bem como o bem-estar animal e a integridade das amostras coletadas. O questionário foi baseado numa revisão da literatura e incluiu perguntas fechadas relacionadas à origem do gado (nascimento na fazenda, comprado e transferência entre fazendas do proprietário), descarte dos resíduos de nascimento, tipos de cepa das vacinas utilizadas (cepa RB51, cepa S19 ou ambas as cepas), vacinação (bezerros 3-8 meses, novilhas e vacas), co-pastejo com outras espécies,

compartilhamento de fontes de água, presença de urubus, acesso de animais silvestres aos resíduos de nascimento, métodos de eliminação para leite descartado (curral, fossa séptica e fornecimento para o bezerro), status de brucelose (livre, desconhecido, positivo), processo de ordenha (curral, sistema mecânico no curral e ordenha em sala), tipo de acasalamento [inseminação artificial (IA), utilização de touro ou ambos] e variáveis que pode estar associadas à brucelose bovina (Anexo B).

Os questionários individuais dos animais coletados foram realizados para a identificação de variáveis como: origem da vaca, idade (24-36 meses, > 36-60 meses, > 60 meses), dias de gestação, número de nascimentos, presença/ausência de reforço de vacinação com cepa atenuada rugosa RB51, problemas reprodutivos (aborto, bezerros fracos, retenção de membranas fetais) e o tipo de acasalamento [inseminação artificial (IA), touro, ambos] (Anexo C). Tanto o questionário epidemiológico quanto o questionário individual foram pré-testados e validados por proprietários de fazendas que não pertenciam ao estudo.

2.7. Coleta de Amostra

Uma vez selecionados aleatoriamente, os animais foram conduzidos pelos trabalhadores ao curral de manejo para a coleta de sangue, a pele da área foi limpa com clorexidina 5%. Foram coletados 6 ml de sangue de cada animal por acesso venoso caudal e armazenado em tubos de coleta de sangue sem anticoagulante. A separação dos coágulos foi feita com os tubos em repouso em temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram refrigeradas entre 4 – 8 °C e transportadas adequadamente em geladeira de isopor para o laboratório (Figura 5).

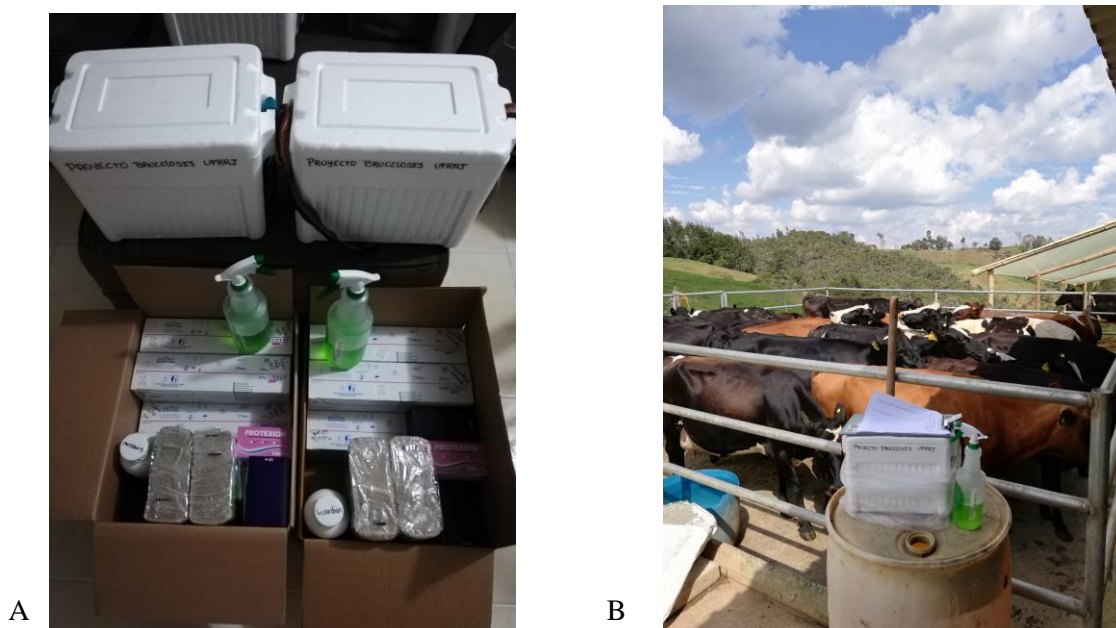


Figura 5. (A) Materiais para coleta de amostra nas fazendas. (B) Animais em curral de manejo antes da coleta de amostras fazenda Encenillo, San Pedro de los Milagros

2.8. Teste sorológico

Foi realizado como triagem inicial o Teste da Placa Rosa Bengala (RBT). Após esta etapa, as amostras foram submetidas a dois teste confirmatório: teste da Fluorescência polarizada (FPA) e teste de Elisa competitiva (cELISA), no Laboratório Nacional de Diagnostico Veterinário (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a, 2017). De acordo com as normas oficiais do Controle, Prevenção e Erradicação do Programa de brucelose na Colômbia, um animal somente é considerado positivo quando os dois testes sorológicos confirmatórios são positivos. As combinações de testes sorológicos foram utilizadas para melhorar a *Se* e *Sp*, atendendo as normas oficiais do Programa de Controle, Prevenção e Erradicação da Brucelose da Colômbia (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2017, 2020a)

2.8.1. Teste rosa bengala

O Teste da Placa Rosa Bengala (RBT) foi utilizado como triagem e processado em laboratório autorizado pela Instituto Colombiano de Agricultura (ICA) para diagnóstico de brucelose (número de aprovação 027-2016). O soro e o antígeno são depositados em quantidades iguais (0,03 ml) em bandejas de plástico ou vidro e são misturados. Após 4 minutos, os resultados devem ser interpretados. A aglutinação determina um resultado positivo para RBT. As amostras que não apresentaram aglutinação foram consideradas negativas.

2.8.2. Teste Fluorescência polarizada

Os resultados do FPA foram expressos em milipolarizações (mP). Uma amostra foi considerada positiva quando apresentou resultado igual ou superior a 121 mP. As amostras com resultados iguais ou inferiores a 107 mP foram consideradas negativas e aquelas que apresentaram resultados entre 108 à 120 mP foram considerados suspeitos.

2.8.3. Elisa competitiva

Na cELISA, os resultados foram obtidos pela comparação da densidade óptica (OD) da amostra e a OD do controle positivo, resultando na densidade óptica média a 450 nm. Para a interpretação dos resultados, as amostras com uma porcentagem de inibição (PI) $\geq 30\%$ foram consideradas positivas para a presença de anticorpos contra *Brucella* spp. e aquelas com IP $< 30\%$ foram consideradas negativas. Todos os testes sorológicos foram realizados e interpretados de acordo com os procedimentos padronizados da OIE. As combinações de testes sorológicos foram utilizadas para melhorar a *Se* e *Sp*, cumprindo as normas oficiais de controle, prevenção e erradicação do programa de brucelose na Colômbia.

2.9. Controle de erros e viés

Fonte	Controle
Questionário	Foi baseado numa revisão exaustiva da literatura
Entrevistado	Perguntas fechadas Respostas específicas
Entrevistador	Manual do entrevistador Treinamento prévio e conscientização (*)
Laboratório	Prova piloto com 10 produtores que não pertenciam à população de estudo As amostras foram designadas por numeração, sem identificação da fazenda As amostras foram processadas em laboratórios oficiais do governo para o diagnóstico da brucelose bovina, de acordo com os padrões internacionais de referência da OIE.

(*) Os profissionais tiveram 12 horas de treinamento prévio antes de iniciar a amostragem, a fim de fortalecê-los no preenchimento do questionário, garantir a confiabilidade na coleta de dados, bem como o bem-estar animal e a integridade das amostras coletadas.

2.10 Análise espacial

As informações coletadas foram planilhas em Excel e convertidas para o formato shapefile para ser executada no software QGIS, com a Licença Pública Geral GNU, sob código 31978 do European Petroleum Survey Group (EPSG). Os dados foram plotados na base de dados cartográficos, obtidos do Departamento Administrativo Nacional de Estatística (DANE) da Colômbia em formato shapefile. Esse banco de dados reúne informações sobre estados, municípios, rodovias, entre outros. A ferramenta de geoprocessamento QGIS, foi utilizada para traçar a área de influência das estradas do Departamento de Antioquia. As distâncias ≤ 200 m, entre 200 m e 1.000 m e >1.000 m, dessas estradas foram utilizadas para identificar o número de fazendas leiteiras na área. A plotagem das fazendas leiteiras que foram positivas nos testes FPA e cELISA foi realizada usando a ferramenta *Intersec*. Essas fazendas positivas foram plotadas com a utilização de símbolos de tamanhos diferentes, proporcionais aos números de casos positivos em cada fazenda leiteira, para identificar áreas com maior número de casos identificados em cada método de detecção

2.11. Análise estatística

Nas análises estatísticas, inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados. Na análise bivariada, os testes Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar a associação entre bruceloses (binário desfecho: soropositivo / soronegativo) e todas as variáveis explicativas relacionadas aos animais e ao rebanho. O p-valor $<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As variáveis independentes estatisticamente significativas, assim como as variáveis independentes com um p-valor $< 0,25$ que foram consideradas importantes, de acordo com outros estudos epidemiológicos, foram inseridas em análise multivariados a través de modelos de regressão logística (LONDOÑO, 2010). As variáveis

foram incluídas nos modelos com base no método *forward "wald"*, o modelo incluiu inicialmente todas as variáveis independentes menores a *p*-valor 0,25 (LONDOÑO, 2010) e excluiu variáveis em cada etapa, até que apenas as variáveis realmente explicativas para o modelo permaneceram. Uma variável independente foi incluída no modelo quando o teste de “*wald*” indicou que o respectivo coeficiente de regressão diferiu significativamente de 0, e foi excluída se o respectivo coeficiente de regressão não diferiu significativamente de 0, além de seu intervalo de confiança cobrir o 1, o que significava que a variável não tinha efeito sobre a variável dependente. Considerou-se também se a introdução desta variável no modelo, mudava os AOR das outras variáveis independentes. Antes de construir o modelo final, a colinearidade entre as variáveis independentes foi testada por meio de tabulação cruzada utilizando o teste exato de Fisher. Quando duas variáveis eram encontradas com alta colinearidade, apenas a variável que tinha mais relevância, de acordo com a revisão da literatura, foi incluída no modelo. A validade do modelo para os dados observados foi avaliada pelo teste de ajuste de *Hosmer-Lemeshow* ($p > 0,05$). Finalmente, os coeficientes foram estimados e a adequação e utilidade do modelo foram identificadas.

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa estatístico IBM SPSS (Statistical Package for as Ciências Sociais) v.25.0 para Windows (Armonk, Novo York: IBM Corp.).

2.12. Declaração de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Aprovação CEP nº 1.243/18) (Anexo D) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Aprovação CEUA nº 8427171219) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

3. RESULTADOS

Um total de 656 vacas foram amostradas de 40 rebanhos leiteiros em quatro municípios do norte de Antioquia: Belmira, Entrerrios, San Pedro de los Milagros e Santa Rosa de Osos. Das fazendas escolhidas, 40% (n = 16/40) estavam livres de brucelose; 37,5% (n = 15/40) não faziam parte de um programa do governo e desconheciam sua condição sanitária de brucelose; 22,5% (n = 9/40) eram fazendas infectadas com brucelose.

A soroprevalência ao nível animal de *Brucella* spp. foi de 6,5% (n = 43/656; IC 95%: 6,0,6,9) e a soroprevalência do rebanho foi de 27,5% (n = 11/40; IC 95%: 21,2,33,8). Foi observada uma variação da soroprevalência entre os municípios de estudo apresentando-se maior no município de San Pedro de los Milagros com uma prevalência em relação aos animais de 21,9% (n = 23/105; IC 95%: 18,6,25,2) e em de rebanho, foi de 71,4% (n = 5/7; IC 95%: 55,9-86,8). O segundo município de maior prevalência foi Entrerrios, com prevalência em relação aos animais de 6,5% (n = 11/169; IC 95%: 5,6,7,4) e em relação ao rebanho de 22,2% (n = 2/9; IC 95%: 10,7,33,7); Santa Rosa de Osos apresentou uma prevalência em relação aos animais de 2,7% (n = 8/289; IC 95%: 2,3,3,0) e em relação ao rebanho de 16,6% (n = 3/18; IC 95%: 10,1-23,1). A menor prevalência foi encontrada em Belmira com 1,1% em relação aos animais (n = 1/93; IC 95%: 0,8–1,3) e em relação ao rebanho 16,6% (n = 1/6; IC 95%: 5,3–27,9) (Tabela 3 e 4) (Figura 6).

Tabela 3. Soroprevalência de brucelose em relação aos animais no 2019, estimativas para cada município do norte de Antioquia, Colômbia, usando 95% de confiança.

Município	n	Teste					
		RBT		FPA		cELISA	
		+(%P)	(95% IC)	+(%P)	(95% IC)	+(%P)	(95% IC)
Belmira	93	1 (1.1)	(0.8–1.3)	1 (1.1)	(0.8–1.3)	1 (1.1)	(0.8–1.3)
Entrerrios	169	16 (9.4)	(8.0–10.7)	11 (6.5)	(5.6–7.4)	11 (6.5)	(5.6–7.4)
San Pedro de Milagros	105	30 (28.5)	(24.6–32.5)	23 (21.9)	(18.6–25.2)	23 (21.9)	(18.6–25.2)
Santa Rosa Osos	289	26 (8.9)	(7.9–9.8)	8 (2.7)	(2.3–3.0)	8 (2.7)	(2.3–3.0)
Total	656	72 (10.9)	(10.2–11.7)	43 (6.5)	(6.0–7.0)	43 (6.5)	(6.1–7.0)

RBT: Rosa de Bengala; FPA: Fluorescência Polarizada; cELISA: Elisa Competitiva; (95% IC): intervalo com 95% de confiança; n: número de soropositivos; (P%) prevalência; +: positivo.

Tabela 4. Soroprevalência de brucelose em relação aos rebanhos no 2019, estimativas para cada município do norte de Antioquia, Colômbia, usando 95% de confiança.

Município	n	Teste					
		RBT		FPA		cELISA	
		+(%P)	(95% IC)	+(%P)	(95% IC)	+(%P)	(95% IC)
Belmira	6	1 (16.6)	(5.3–27.9)	1 (16.6)	(5.3–27.9)	1 (16.6)	(5.3–27.9)
Entrerrios	9	6 (66.6)	(51.8–81.4)	2 (22,2)	(10.7–33.7)	2 (22,2)	(10.7–33.7)
San Pedro Milagros	7	5 (71.4)	(55.9–86.8)	5 (71.4)	(55.9–86.8)	5 (71.4)	(55.9–86.8)
Santa Rosa Osos	18	11 (61.1)	(49.9–72.3)	3 (16,6)	(10,1–23,1)	3 (16,6)	(10,1–23,1)
Total	40	23 (57.5)	(49.7–65.2)	11 (27.5)	(21.2–33.8)	11 (27.5)	(21.2–33.8)

RBT: Rosa de Bengala; FPA: Fluorescência Polarizada; cELISA: Elisa Competitiva; (95% IC): intervalo com 95% de confiança; n: número de soropositivos; (P%) prevalência; +: positivo.

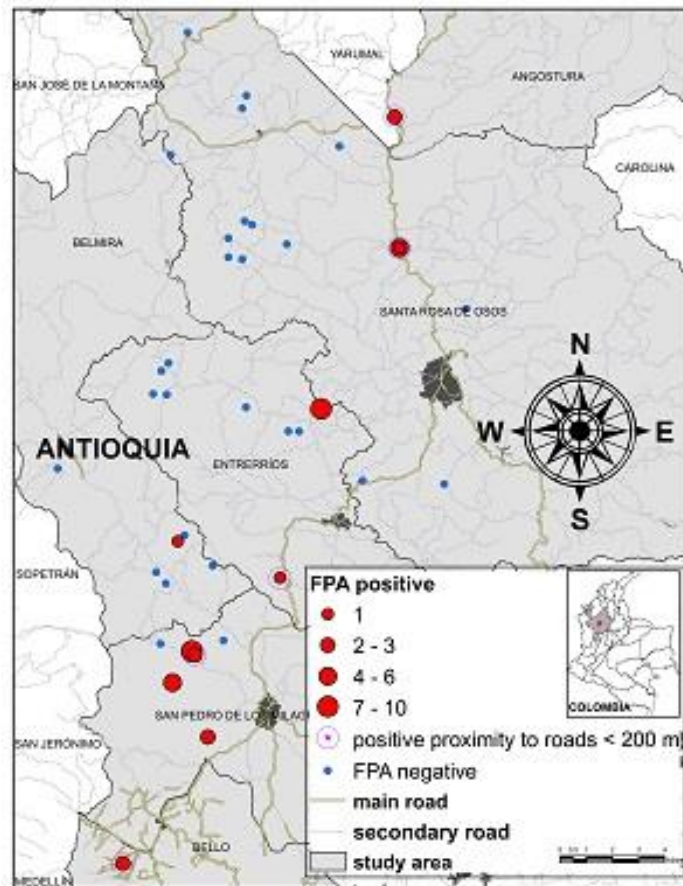


Figura 6. Distribuição espacial da presença de anticorpos de *Brucella* spp. nos rebanhos, proximidade das principais estradas e número de vacas positivas por sorologia na região leiteira de Antioquia, Colômbia.

As análises bivariadas da soropositividade para *Brucella* spp. indicaram em relação aos animais que a origem das vacas (compradas ou transferidas) (p 0,010; OR 2,26; IC 95%: 1,19-4,28), o uso de um touro ou IA (p 0,000; OR 5,68; IC 95%: 2,89-11,15), a presença de problemas reprodutivos (p 0,000; OR 4,74; IC 95%: 2,43-9,26), o aborto (p 0,001; OR 3,78;

IC 95%: 1,80-7,96), e nascimento de bezerros fracos (p 0,023; OR 6,49; IC 95%: 1,61-26,06), a vacinação de vacas com a vacina da cepa RB51 (p 0,026; OR 2,00; IC 95%: 1,07-3,73), a ordenha em sistema de sala (p 0,007; OR 2,50; IC 95%: 1,26-4,97), e o descarte de leite para alimentação dos bezerros (p 0,050), foram significativamente associados à soropositividade ($p < 0,05$).

Além disso, as variáveis extrínsecas, como o compartilhamento de fonte de água com animais de fazenda vizinhos (p 0,000; OR 4,98; IC 95%: 2,07-11,98), co-pastejo com outra espécie (p 0,020; OR 3,73; IC 95%: 1,13-12,24), ausência de baia-maternidade exclusiva (p 0,001; OR 3,35; IC 95%: 1,53-7,34) e a condição de saúde da fazenda frente a brucelose (p 0,000), foram fatores associados a soropositividade ($p < 0,05$). A presença de urubus e gambá foi comum na maioria das fazendas, porém, quando os roedores estavam presentes, ocorreu uma associação significativa (p 0,000). Embora possa parecer controverso, quando não havia procedimentos adequados para o descarte dos resíduos do parto, associado ao acesso livre dos urubus a esses resíduos, foi observada uma associação com fator de proteção (p 0,001; OR 0,25; IC 95%: 0,11-0,55) (Tabela 5). As análises bivariadas, em relação ao rebanho, indicaram que o município (p 0,040), e o nascimento de bezerros fracos (p 0,014; OR 7,50; IC 95%: 1,53-36,71) apresentaram associação com a soropositividade. Além disso, a criação de bezerros nas fazendas pareceu estar associada com fatores de proteção (p 0,019) (Tabela 6).

Todas as variáveis significativas, em relação aos animais e ao rebanho ($p < 0,05$), foram incluídas na análise de regressão logística. As associações que não foram significativas, com p -valor $< 0,25$: retenção de membranas fetais (p 0,183) em relação aos animais, bem como status de brucelose (p 0,078), aborto (p 0,189) e procedência dos animais (p 0,073) em relação ao rebanho foram considerados como potenciais fatores de risco e, consequentemente, foram incluídas na análise de regressão logística (LONDOÑO, 2010).

O modelo final de regressão logística, em relação aos animais, incluiu a origem do animal (comprado ou transferido), histórico de aborto, nascimento de bezerros fracos, uso de touro para monta e vacinação com RB51 na idade adulta. O modelo conseguiu explicar de forma correta 73,8% dos casos. Todas as variáveis do modelo apresentaram valor de $p < 0,05$ e podemos afirmar que as variáveis independentes influenciaram as variáveis dependentes (animal soropositivo). O teste de ajuste de Hosmer–Lemeshow mostrou que o modelo se ajustou aos dados ($X^2 = 2,73$, d.f. 6, valor $p = 0,841$). No modelo final, em relação aos animais, as vacas montadas com touro tiveram quase dez vezes mais chances de serem soropositivas do que as vacas inseminadas (AOR = 9,69, IC 95%: 2,23,42,18). A procedência

das vacas (compradas ou transferidas) apresentou três vezes mais probabilidade de ser soropositiva do que as nascidas dentro da fazenda (AOR = 2,79, IC 95%: 1,42,5,49). Foi observada uma probabilidade quatro vezes maior de ser soropositivos os animais com histórico de aborto (AOR = 4,22, IC 95%: 1,91,9,33). O nascimento de bezerros fracos (AOR = 13,77, IC 95%: 2,75,68,91) teve quatorze vezes mais chance de ser soropositivo. A última variável do modelo foi a vacinação com a cepa RB51 na idade adulta. Esta apresentou três vezes mais chances de ser soropositivo (AOR = 3,03, IC 95%: 1,04,8,78) (Tabela 7).

O modelo final de regressão logística, em relação ao rebanho, incluiu o nascimento de bezerros fracos e a compra de gado. O modelo é capaz de explicar corretamente 82,5% dos casos positivos. Todas as variáveis apresentaram valor de $p < 0,05$, o que afirma que as variáveis independentes influenciam a variável dependente (rebanho soropositivo). O teste de Hosmer–Lemeshow mostrou que o modelo se ajustou aos dados ($X^2 = 0,40$, d.f. 2, p valor = 0,81). Ao final, no modelo em relação ao rebanho, a variável relacionada a compra de gado teve sete vezes mais chances de ser soropositiva (Tabela 7).

Tabela 5. Distribuições de frequência e análise bivariada de respostas dicotômicas as perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.

Variável	Frequência	Quantidade de animais = 656		
		%	P**	OR (IC 95%)
Procedência dos animais			0.010	2.261 (1.19, 4.28)
Compra e/ou transferência de animais.	27/289	62.8		
Nascimento	16/367	37.2		
Idade			0.805	
24-36 meses	10/150	23.3		
37-60 meses	15/258	34.9		
>60 meses	18/248	41.9		
Tempo de gestação			0.836	
Não gestante	17/257	39.5		
1-90 dias	11/147	25.6		
>90 dias	15/252	34.9		
Número de vacas prenhas			0.764	
Novilha	2/20	4.7		
1-2	18/279	41.9		
3-4	12/217	27.9		
>4	11/140	25.6		
Problemas reprodutivos			0.000	4.74 (2.43,9.26)
Sim	16/84	37.2		
Não	27/572	62.8		
Aborto			0.001	3.78 (1.80, 7.96)
Sim	11/62	25.6		
Não	32/594	74.4		
Retenção placentária			0.183	2.941 (0.62, 13.87)
Sim	2/12	4.7		

Não	41/644	95.3		
Nascimentos Bezerros fracos			0.023	6,493 (1.61, 26.06)
Sim	3/10	7.0		
Não	40/646	93.0		
Destino de placentas, fetos abortados e natimortos			0.000	0.123 (0.05, 0.28)
Nenhum	33/624	76.7		
Enterrados	10/32	23.3		
Baia de maternidade exclusiva			0.001	3.354 (1.53, 7.34)
Não	35/382	81.4		
Sim	8/274	18.6		
Co-pastejo			0.020	3.730 (1.13, 12.24)
Sim	40/519	93.0		
Não	3/137	7.0		
Fontes de água compartilhadas			0.000	4.984 (2.07, 11.98)
Sim	37/376	86.0		
Não	6/280	14.0		
Métodos de reprodução			0.000	
Inseminação artificial (AI)	2/186	4.7		
Touro	11/263	25.6		
IA e Touro	30/207	69.8		
Touro			0.001	7.364 (1.761-30.789)
Sim	41/492	95.3		
Não	2/164	4.7		
IA			0.045	2.031 (1.005-4.104)
Sim	32/393	74.4		
Não	11/263	25.6		
IA e Touro			0.000	5.684 (2.898-11.151)
Sim	30/207	69.8		
Não	13/449	30.2		
Vacinação de reforço			0,026	2.004 (1.07, 3.73)
Sim	24/261	55.8		
Não	19/395	44.2		
Destino do leite descarte:			0.050	
Bezerros	27/296	62.8		
Fossa séptica	4/105	9.3		
Pastagens	12/255	27.9		
Municipalidade			0.000	
San Pedro de los Milagros	23/105	53.5		
Entrerrios	11/169	25.6		
Santa Rosa de Osos	8/289	18.6		
Belmira	1/93	2.3		
Status de brucelose			0.000	
Status positivo	25/157	58.1		
Status livre de brucelose	6/264	14.0		
Status desconhecido	12/235	27.9		
Ordenha mecânica			0.007	2.509 (1.26, 4.97)
Sim	31/342	72.1		
Não	12/314	27.9		
Tipo de ordenha			0.009	
Sala e ordenha mecânica	31/342	72.1		

Piquete e ordenha mecânica	12/247	27.9		
Piquete e ordenha manual	0/67	0.0		
Acesso de urubus aos resíduos de nascimento			0.001	0.255 (0.11, 0.55)
Sim	33/602	76.7		
Não	10/54	23.3		
Urubus, gambás, e ratos			0.000	3.621 (1.70, 7.67)
Sim	34/347	79.1		
Não	9/309	20.9		
Presença de animais selvagens			0.000	
Urubus	8/134	18.6		
Urubus e gambás	0/74	0.0		
Urubus, gambás, ratos	34/347	79.1		
Urubus, gambás, outro	1/90	2.3		
Sem presença	0/11	0.0		

%; percentagem de positivos; p-valor: estatisticamente significativo; OR: razão de chances; (IC del 95%): intervalo de confiança com $p^{**} < 0,05$.

Tabela 6. Distribuições de frequência e análise bivariada de respostas politômicas a perguntas de pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.

Em relação ao rebanho = 40				
Variável	Frequência	%	P**	OR (IC 95%)
Procedência dos animais			0.073	5.538 (1.01, 30.25)
Compra e/ou transferência de animais.	9/22	81.8		
Nascimento	2/18	18.2		
Criação de bezerros na fazenda			0.019	0.621 (0.467, 0.825)
Sim	11/29	100		
Não	0/11	0		
Aborto			0.159	0.667 (0.52, 0.84)
Sim	11/33	100		
Não	0/7	0.0		
Retenção placentária			0.486	0.677 (0.41, 8.59)
Sim	8/25	72.7		
Não	3/15	27.3		
Nascimentos de bezerros fracos			0.014	7.500 (1.53, 36.71)
Sim	6/10	54.5		
Não	5/30	45.5		
Destino de placentas, fetos abortados e natimortos			0.479	0.357 (0.02, 6.26)
Nenhum	10/38	90.9		
Enterrados	1/2	9.1		
Baia de maternidade exclusiva			0.486	1.882 (0.41, 8.59)
Não	8/25	72.7		
Sim	3/15	27.3		
Co-pastejo			0.405	3.182 (0.34, 29.43)
Sim	10/32	90.9		
Não	1/8	9.1		
Fontes de água são compartilhadas			0.473	2.167 (0.47, 9.86)
Sim	8/24	72.7		

Não	3/16	27.3		
Métodos de reprodução			0.419	
Inseminação artificial (AI)	2/10	18.2		
Touro	4/18	36.4		
IA e Touro	5/12	45.5		
Tipo de cepas vacinais			0.623	
cepa RB51	9/29	81.8		
cepa B19	1 /4	9.1		
Ambas as cepas	0/4	0.0		
Sem vacinação	1/3	9.1		
Destino do leite no tratamento ou com mastite:			0.332	
Bezerros	7/18	63.6		
Fossa séptica	1/7	9.1		
Pastagens	3/15	27.3		
Status de brucelose			0.078	
Status positivo	5/9	45.5		
Status livre de brucelose	4/16	36.4		
Status desconhecido	2/15	18.2		
Ordenha mecânica			0.728	1.354 (0.33, 5.55)
Sim	5/16	45.5		
Não	6/24	54.5		
Tipo de ordenha			0.338	
Sala, ordenha mecânica	6/19	54.5		
Piquete, ordenha mecânica	5/16	45.5		
Piquete, ordenha manual	0/5	0.0		
Municipalidade			0.040	
San Pedro de los Milagros	5/7	45.5		
Entrerriós	2/9	18.2		
Santa Rosa de Osos	3/18	27.3		
Belmira	1/6	9.1		
Fazenda cercadas			1.000	1.393 (1.144-1.696)
Completamente	11/39	100		
Parcialmente	0/1	0.0		
Acesso de urubus aos resíduos de nascimento			1.000	0.741 (0.06, 9.09)
Sim	10/37	90.9		
Não	1/3	9.1		
Urubus, gambás, e ratos			1.000	0.921 (0.22, 3.92)
Sim	7/26	63.6		
Não	4/14	36.4		
Presença de animais selvagens			0.697	
Urubus	3/8	27.3		
Urubus e gambás	4/18	36.4		
Urubus, gambás, ratos	3/7	27.3		
Urubus, gambás, outro	1/6	9.1		
Sem presença	0/1	0.0		

%; percentagem de positivos; p-valor: estatisticamente significativo; OR: razão de chances; (95% IC): intervalo com 95% de confiança.

Tabela 7. Modelo multivariado com potenciais fatores de risco ao nível do animal e do rebanho para soropositividade *Brucella* spp. em gado leiteiro de Antioquia, Colômbia.

Fatores	Categoria	Quantidade de animais = 656				Quantidade de rebanhos = 40			
		β	S.E (β)	p^{**}	OR (IC 95%)	β	S.E (β)	p^{**}	OR (IC 95%)
Métodos de reprodução	Touro	2.27	0.775	0.002	9.69 (2.23, 42.18)				
	AI	ref.							
Procedência	Compra ou transferência	1.02	0.345	0.003	2.79 (1.42, 5.49)	1.977	0.993	0.047	7.223 (1.03, 50.62)
	Nascimento	ref.							
Aborto	Sim	1.44	0.40	0,000	4.22 (1.91, 9.33)				
	Não	ref.							
Bezerros fracos	Sim	2.62	0.82	0.001	13.77 (2.75, 68.91)	2.262	0.933	0.015	9.606 (1.54, 59.76)
	Não	ref.							
Vacinação de reforço	Sim	1.09	0.543	0.043	2.99 (1.03, 8.58)				
	Não	ref.							
	Constante	-6,42	0,938	0,000		-2,97	0,971	0,002	

Variável dependente: animal positivo, resultados dados com β : beta; S.E: erro padrão; OR: razão de chances; (95% IC): intervalo com 95% de confiança.

4. DISCUSÃO

Este estudo encontrou uma prevalência de brucelose de 6,5% em relação aos animais e 27,5% em relação ao rebanho. Os resultados de prevalência aumentaram em comparação à prevalência média relatada pelo ICA entre 2005-2016, tanto no departamento (4,3% em relação aos animais e 25,9% em relação ao rebanho) quanto no nível nacional (4,4% em relação aos animais e 22 % em relação ao rebanho). Assim como, os resultados de prevalência de animais soropositivos em relação à última prevalência oficial publicada pelo ICA no 2016, tanto no departamento (3% em relação aos animais e 29% em relação ao rebanho) quanto em nível nacional (3,5% em relação aos animais e 17% em relação ao rebanho) (AVILA-GRANADOS et al., 2019; INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2016). O aumento da prevalência confirma a necessidade da promulgação da quarentena de brucelose na região de estudo em 2018 (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2019, 2018a). Também no último estudo de soroprevalência, feito pelo ICA no ano 2019 (Dados não publicados), classificaram o país em zona de baixa, meia e alta prevalência. O departamento de Antioquia foi classificado na zona de alta prevalência, apresentando uma prevalência de 12,56% em relação aos animais e 44,02% em relação ao rebanho.

Dos quatro municípios, a maior prevalência foi encontrada em San Pedro de los Milagros, tanto em animais individuais quanto em rebanhos. Este município foi um dos primeiros a evidenciar um aumento da soropositividade na região, inclusive antes da quarentena. A falta de ferramentas diretas de diagnóstico impossibilita a identificação de quais anticorpos para *Brucella* spp. foram induzidos (cepas de campo ou vacinais), sendo uma grande limitação logística e econômica do ICA para o desenvolvimento e vigilância oportuna das estratégias de controle da brucelose e a análise adequada dos focos, facilitando o aumento do número de casos em toda a região.

A brucelose bovina se espalha facilmente em regiões leiteiras porque as condições ambientais destas produções e as práticas de manejo intensivo oferecem uma excelente oportunidade para que as bactérias se multipliquem e disseminem a doença rapidamente (BUGEZA et al., 2019; COELHO et al., 2015). Desta forma, a estreita interação entre animais e pessoas nesse tipo de produção, apresenta um risco de transmissão de doenças zoonóticas para os trabalhadores e suas famílias (COELHO et al., 2015).

Neste estudo foram observadas, associações significativas com a soropositividade de *Brucella* spp., em relação ao rebanho, nas seguintes variáveis: município, histórico de aborto, nascimento de bezerros fracos e não criação de bezerros nas fazendas e, assim mesmo, muitas

variáveis foram significativamente associadas à soropositividade em relação aos animais. Algumas dessas variáveis significativas não conseguiram explicar o modelo, mas foram discutidas devido à sua importância biológica, consideradas fatores de risco em estudos com cenários semelhantes.

Em regiões leiteiras, existem condições favoráveis de alta umidade e baixa temperatura para a manutenção da *Brucella* spp. no ambiente. Nessas condições, as bactérias podem sobreviver no solo, água e esterco por até 10 semanas (CROSS et al., 2013, 2007; KADEN et al., 2018; SILVA et al., 2019). O uso de esterco de vaca como fertilizante é uma prática regular em fazendas leiteiras da região, que pode se tornar um fator de risco. *Brucella* sp. foi isolada de esterco de vacas e cabras soropositivas em uma região endêmica no México e os autores propõem avaliar o esterco contaminado como fator de risco em regiões endêmicas (MORALES-ESTRADA et al., 2016), embora os dados avaliados em nosso estudo não evidenciam essa associação.

A maioria dos fatores associados a introdução e disseminação da brucelose na pecuária estão diretamente relacionados às práticas de manejo que facilitam a proliferação da *Brucella* spp. nos rebanhos (RHYAN et al., 2013) e foram associadas à soropositividade, como o co-pastejo de animais (EDAQ et al., 2018; SILVA et al., 2019), o compartilhamento de fontes de água com fazendas vizinhas (CÁRDENAS et al., 2019b), e a falta de baía de maternidade exclusiva (HOLT et al., 2011; SILVA et al., 2019). Entretanto, a introdução de novos animais nos rebanhos, adquiridos ou transferidos, poderia ser o fator de risco mais predominante. Isso foi comprovado neste estudo, e amplamente divulgado por outros estudos epidemiológicos (CÁRDENAS et al., 2019b; MATOPE et al., 2010; SILVA et al., 2019).

A ordenha em sala foi associada à soropositividade em relação aos animais. Os autores que relataram resultados semelhantes, atribuíram essa associação ao contato próximo entre os animais e pelo tempo em que as vacas permaneceram na sala no processo de ordenha (ARIF et al., 2019; BUGEZA et al., 2019; EDAQ et al., 2018).

O uso de leite descartada para alimentação de bezerros também apresentou associação significativa com a soropositividade. Estudos relataram a potencial liberação de bactérias viáveis através das glândulas mamárias (BUGEZA et al., 2019; HULL and SCHUMAKER, 2018; PLOMMET et al., 1973). Isto foi demonstrado em um estudo que isolou *Brucella suis* durante dois anos, a partir do leite de vacas naturalmente infectadas (EWALT et al., 1997). Da mesma forma, outro estudo detectou por cultura e PCR *Brucella* spp. de 24 amostras de leite de

vacas, 12 de ovelhas, e 10 de cabras. Todos os animais pertenciam as fazendas com históricos de brucelose (HAMDY & AMIN, 2002)

Atualmente, não se tem estabelecido um tempo de descarte do leite de vacas vacinadas com a cepa RB51, isto pode apresentar um fator de risco para os bezerros em lactação e para as pessoas, pois um potencial derramamento das cepas vacinais no leite pode ocorrer (NEGRÓN et al., 2019; PACHECO, 2007). Embora um estudo tenha avaliado a excreção das cepas vacinais no leite por cultura e por PCR de 18 vacas vacinadas com uma dose completa de RB51 durante a lactação, foi possível concluir que o risco para a saúde pública associado ao consumo de leite pós-parto de vacas vacinadas com RB51 é muito baixo (MIRANDA et al., 2016). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recentemente estudou três casos de brucelose em humanos. Os indivíduos apresentaram a cepa da vacina RB51 e contraíram brucelose pela ingestão de leite não pasteurizado (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019; COSSABOOM ET AL., 2018; NEGRÓN ET AL., 2019).

A vacinação de bezerros faz parte dos programas regulares de controle sanitário em países endêmicos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL, 2019). Na Colômbia, a vacinação com a cepa B19 requer apenas uma única vacinação de bezerras. Já em relação aquelas que são vacinadas com a RB51 devem receber o imunizante entre 3 e 9 meses de idade e serem revacinadas na idade adulta (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2020a). Dos bovinos avaliados, a cepa RB51 foi a vacina predominantemente utilizada. Esta vacina, quando foi aplicada na idade adulta, teve associação significativa com soropositividade em relação as análises feitas nos animais.

A quarentena da região poderia ter influenciado as revacinações e as vacinações estratégicas das vacas, mas os resultados sorológicos deveriam ser interpretados com cautela, especialmente num país endêmico onde a prevalência se modifica constantemente (OLSEN & PALMER, 2014). Uma alta prevalência pode aumentar a suscetibilidade dos animais e diminuir a eficácia e o efeito protetor da vacina. A imunidade induzida pela vacina também pode entrar em colapso se a infecção com uma cepa virulenta aumentar, reduzindo a eficácia da vacina (Langwig et al., 2019). Outra interpretação potencial é que os anticorpos das cepas em ambas as vacinas (B19 e RB51) podem persistir na idade adulta e desencadear uma reação cruzada sorológica positiva (CLOECKAERT ET AL., 2002B; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Não existe cura para a brucelose em animais e não é permitido o tratamento, a única medida de controle é o abate dos animais positivos (WORLD

ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Portanto, a erradicação de animais falso-positivos deve ser levada em consideração (MOGOLLÓN et al., 2003).

A soropositividade em relação aos animais também apresentou associação significativa com a presença de animais selvagens, o que é consistente com outros estudos realizados no Brasil, Zimbábue e Estados Unidos (NDENGU et al., 2017; RHYAN et al., 2013; SILVA et al., 2019). Algumas evidências sugerem que animais selvagens, pássaros e cães podem carregar pedaços de placenta ou fetos abortados do pasto, desempenhando um papel significativo na transmissão brucelose nos bovinos (BERCOVICH, 1998). Portanto, uma vigilância permanente da vida selvagem e dos animais sinantrópicos é fortemente recomendada, uma vez que esses animais podem servir como potenciais reservatórios ou vetores mecânicos (GODFROID, 2018; LOVERA et al., 2017).

A presença de urubus e gambás foi comum na maioria das fazendas. No entanto, houve associação significativa a soropositividade em relação aos animais, quando, além dos urubus e gambas, estavam presentes no ambiente roedores. Isto concorda com um estudo no centro da Argentina, que evidenciou anticorpos de *Brucella* spp. em roedores e gambás capturados em fazendas leiteiras (LOVERA et al., 2017). A presença de infecção de roedores por *Brucella* spp. não devem ser subestimada e sim explorada detalhadamente como fator de risco em ambientes rurais.

Neste estudo, o acesso dos urubus a resíduos de parto ou aborto parece ser um fator de proteção associado. Os urubus podem impedir a propagação de bactérias no ambiente porque ingerem resíduos da placenta ou aborto dentro de 24 horas após o evento (CROSS et al., 2013; MAICHAK et al., 2009; RHYAN et al., 2013). Este processo de eliminação natural de resíduos do parto ou aborto pode ser mais rápido do que o descarte feito pelo agricultor. Até o momento, não foi determinado que os urubus são um fator de risco de transmissão da brucelose no gado, pois parecem reduzir o risco e provavelmente atuar como um agente de controle biológico da doença (AUNE et al., 2012; MAICHAK et al., 2009; VICENTE et al., 2019). Em ambientes naturais, os urubus desempenham um papel importante no ecossistema ao descartar a carniça que, de outra forma, seria um terreno fértil para proliferação de doenças. Os urubus apresentam resistência a maioria dos microrganismos patogênicos e suas toxinas. Eles têm um estômago musculoso adaptado, com alta acidez, que os protege das ações patogênicas das bactérias, que são em sua maioria destruídas (MAICHAK et al., 2009).

A presença de aborto e nascimento de bezerros fracos contribuiu para explicar a soropositividade no modelo em relação aos animais e deveria gerar alertas nas fazendas. O

período de incubação da brucelose em bovinos e em outros animais é bastante variável, cerca de 2 semanas a 1 ano e até mais em certos casos. Quando o aborto é o primeiro sinal observado, o período mínimo de incubação é de cerca de 30 dias (JIM QUIGLEY, 2005). Alguns animais podem abortar antes de desenvolver uma reação positiva ao teste diagnóstico. Mas outros animais infectados podem nunca abortar, embora a maioria dos estudos destaquem a presença do aborto como a primeira sinal de alerta para a brucelose (AHASAN et al., 2017; BRONNER et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2008). Geralmente, animais infectados que não abortam, podem ter nascimentos de bezerros fracos e podem desenvolver uma reação positiva ao teste diagnóstico dentro de 30 a 60 dias após a infecção (JIM QUIGLEY, 2005). Mesmo em gestações que cursam até o trabalho de parto no período correto, ocorrem a disseminação da bactéria no ambiente através da excreção da placenta, fluidos fetais e secreções vaginais (LETESSON et al., 2017). Os mecanismos de controle apropriados como baias exclusivas de maternidade e boas práticas de gestão de biossegurança devem estar presentes nas granjas para prevenir a propagação da infecção.

Os touros podem ser infectados com brucelose, por erros durante a vacinação dos bezerros ou pela exposição a um ambiente contaminado (JUNQUEIRA JUNIOR et al., 2018; PACHECO, 2014). A espécie *B. abortus* pode estar presente nos testículos e nas glândulas genitais dos touros (CROSS et al., 2010). A transmissão as fêmeas pode ocorrer pelo sêmen infectado, seja por acasalamento ou por inseminação artificial (ALI et al., 2017; JUNQUEIRA JUNIOR et al., 2018). O uso de touro para monta, a inseminação artificial ou ambos, foram significativamente associados à soropositividade e contribuirão para explicar a soropositividade no modelo de regressão logística ao nível animal. Os resultados deste estudo foram semelhantes a um estudo em Bangladesh (AHASAN et al., 2017) e a um estudo caso-controle recente na Colômbia, onde a criação natural com touros com estado de saúde desconhecido mostrou maior risco, em comparação com as fazendas que usaram inseminação artificial (CÁRDENAS et al., 2019b)

5. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou um aumento na soroprevalência de brucelose em Antioquia, demonstrando a necessidade da declaração de quarentena associada nesta região leiteira localizada na Colômbia.

Os fatores relacionados à introdução de novos animais no ambiente, a presença de aborto, o nascimento de bezerros fracos, o uso de touros como prática reprodutiva e uso da vacina RB51 aplicada na idade adulta, foram considerados fatores de risco associados à soropositividade. Os agricultores devem estar cientes desses fatores e usá-los em conjunto com testes sorológicos para confirmar a presença do gado infectado em suas fazendas.

A brucelose pode ter um impacto severo na saúde humana. Atualmente, não existem vacinas que possam prevenir a brucelose em humanos, por tanto, somente o controle da brucelose em animais reduz drasticamente a incidência da doença em humana. É importante desenvolver estratégias eficazes para prevenir e erradicar a infecção no gado. Programas de vacinação adequados na pecuária, implementação de medidas preventivas para gerenciar fatores de risco, vigilância permanente com estudos epidemiológicos e o diagnóstico correto de casos suspeitos podem melhorar a segurança alimentar e a saúde pública.

Há uma necessidade urgente de uma estruturação do programa de monitoramento e controle contra a brucelose em bovinos na Colômbia, usando uma abordagem coordenada de “Saúde Única”, levando em consideração as consequências econômicas e de saúde pública em relação a brucelose em hospedeiros inespecíficos.

CAPÍTULO II

Estudo transversal e análise molecular de *Brucella* spp. em bovinos de regiões leiteiras da Colômbia.

Este capítulo com algumas pequenas modificações no manuscrito foi publicado em:

HERRÁN RAMIREZ, OL. SANTOS HA, PAULINO PG, VAN DER MEER CS, BAUTISTA JLR, DELGADO ILJ, OBANDO JG, GARCIA RR, DA COSTA ANGELO I. Cross-sectional study of *Brucella* spp. using real-time PCR from bovine whole blood in Colombia. Vet Res Commun. 2021 Nov 17. Epub ahead of print. PMID: 34791575. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09846-8>

RESUMO

Um estudo transversal foi realizado na Colômbia para detectar DNA de *Brucella* spp. de amostras de sangue total de bovinos, por meio da técnica de PCR em tempo real, com a utilização de sonda (qPCR). Cepas de *Brucella*-DNA de campo e as cepas vacinais foram genotipadas mediante um ensaio baseado em marcadores SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*). Os fatores associados a presença de *Brucella*-DNA foram avaliados por meio de modelos de regressão logística. Um total de 656 vacas, amostradas de forma aleatória, de 40 rebanhos foram selecionadas e analisadas. O ensaio qPCR detectou 9,5% (n=62/656; IC 95%: 7,3, 12,0) dos animais com presença de *Brucella*-DNA, enquanto o teste sorológico detectou 6,6% (n=43/656; IC: 4,8, 8,7), dentre estes foi observado que 62,5% (n=25/40; IC 95%: 45,8, 77,3) dos casos positivos foram detectados no rebanho pela qPCR, enquanto apenas 27,5% (n=11/40; IC 95%: 14,6, 43,9) foram detectados pelo teste sorológico. O ensaio qPCR, que utilizou o gene *bcs31*, apresentou uma eficiência de 92,35%. Toda as amostras positivas pela qPCR foram genotipadas como cepas de *Brucella* spp. de campo empregando o ensaio SNP. No modelo de regressão logística em relação aos animais, cinco variáveis foram associadas à presença de *Brucella*-DNA: o uso de touros para monta de vacas (AOR = 2,72, IC 95 % 1,11 - 6,66), histórico de problemas reprodutivos (AOR = 3,14, IC 95 % 1,09 - 8,99), vacas prenhes (AOR = 1,86, IC 95 % 1,03 - 3,36), utilização de sala para ordenha (AOR = 2,92, IC 95 % 1,62 - 5,26) e vacas pertencentes à fazendas ≤ 200 m da principal estrada (AOR = 2,47, IC 95 % 1,39 - 4,39). Em relação ao rebanho, duas variáveis foram associadas à presença de *Brucella*-DNA: histórico de problemas reprodutivos (AOR = 7,76, IC 95 % 1,17 - 51,56) e uso de touros para monta (AOR = 6,49, IC 95 % 1,20 - 35,12). Tendo em vista que o aumento da prevalência de brucelose em reservatórios animais cria um risco importante de transmissão em humanos e, de acordo com a prevalência flutuante da brucelose em países endêmicos, os estudos epidemiológicos atualizados, baseados em testes diagnósticos sorológicos e apoiados com as ferramentas moleculares, melhora a eficácia das estratégias de prevenção e controle. Dessa forma, permitem a avaliação da dinâmica da doença e determinam se as medidas de prevenção e controle estabelecidas foram eficazes ou precisam ser ajustadas.

Palavras-chaves: Zoonoses, bruceloses, probe-qPCR

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted in Colombia to recover *Brucella* spp. DNA from bovine whole-blood samples through probe-based real-time PCR (qPCR). By an SNP-based assay, vaccine strains were genotyped from field strains. The associated factors were evaluated using logistical regression models. A total of 656 random cows from 40 herds were selected and analyzed using serology and PCR. The qPCR assay detected 9.5% (n=62/656; 95% CI: 7.3, 12.0) of the animals with *Brucella*-DNA presence, while the serological test detected a 6.6% (n=43/656; CI: 4.8, 8.7). 62.5% (n=25/40; 95% CI: 45.8, 77.3) of positive cases were detected at the herd-level by the qPCR, while only 27.5% (n=11/40; 95% CI: 14.6, 43.9) were detected by the serological test. All positive samples were identified as field *Brucella* strains employing the SNP-based assay. In the final regression model at the animal-level, five variables were associated with *Brucella*-DNA presence: the use of bulls for mating (AOR = 2,72, IC 95 % 1,11 - 6,66), recorded history of reproductive problems (AOR = 3,14, IC 95 % 1,09 - 8,99), pregnant cows (AOR = 1,86, IC 95 % 1,03 - 3,36), parlor milking (AOR = 2,92, IC 95 % 1,62 - 5,26), and cows belonging to farms ≤ 200 m from the main road (AOR = 2,47, IC 95 % 1,39 - 4,39). At the herd-level, two variables were associated with *Brucella*-DNA presence: recorded history of reproductive problems (AOR = 7,76, IC 95 % 1,17 - 51,56), and the use of bulls for mating (AOR = 6,49, IC 95 % 1,20 - 35,12). Bearing in mind that the increase in the prevalence of brucellosis in animal reservoirs creates an important risk of transmission in humans, and in accordance with the fluctuating prevalence of brucellosis in endemic countries, the updated epidemiological studies based on serological diagnostic tests and supported by molecular tools, improve the efficacy of the prevention and control strategies, allows us to assess the dynamics of the work and determine if the established prevention and control measures are effective or need to be adjusted.

Keywords: Zoonoses, brucellosis, probe-qPCR

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença causada pela bactéria *Brucella* spp., considerada uma zoonose complexa e negligenciada. De acordo com o Plano de Ação para a Eliminação das Doenças Infecciosas Negligenciadas [NIDs (2016-2022)], continua sendo necessário avaliar e documentar a situação epidemiológica regional da brucelose nas Américas. Apesar da América Latina ser endêmica para brucelose, os relatos e dados são insuficientes em relação a prevalência, dificultando o alcance de níveis satisfatórios de controle da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION AND PAN AMERICAN HEALTH Organization, 2016). Dependendo da prevalência encontrada, as estratégias e medidas de controle podem aplicar diferentes ações de gestão (MORENO, 2020). Além disso, a detecção adequada pode ajudar a mitigar o impacto econômico do abate de animais infectados (TROTTA et al., 2020), os custos para recuperar o status “livre de brucelose”, o impacto socioeconômico no desenvolvimento rural e, o mais importante, o impacto na saúde pública.

A cultura bacteriana é considerada o “padrão ouro” para confirmar o diagnóstico de brucelose. No entanto, a maioria das espécies de *Brucella* são organismos fastidiosos e de crescimento relativamente lento, afetando, em alguns casos, a sensibilidade de detecção (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Em vez disso, os estudos epidemiológicos direcionados à brucelose na pecuária baseiam-se quase exclusivamente em testes sorológicos como as principais ferramentas de detecção, devido aos seus resultados rápidos e de baixo custo. No entanto, os testes sorológicos apresentam baixa sensibilidade nos estágios iniciais ou latentes da infecção e baixa especificidade em regiões onde a brucelose é altamente endêmica, onde tem presença de outras bactérias que compartilham a estrutura do O-LPS ou há vacinação em massa de bovinos (CORBEL, 2006; GODFROID et al., 2002). Em países com vacinação massiva, a diferenciação confiável entre cepas vacinais e cepas de campo é importante para os estudos epidemiológicos da brucelose bovina. (GOPAUL et al., 2010). Portanto, ferramentas diagnósticas adaptadas à situação epidemiológica apresentadas precisam ser desenvolvidas e validadas (GODFROID et al., 2002).

Melhorias nos métodos de PCR, como PCR em tempo real (qPCR), tornaram possível a detecção de *Brucella* spp. a partir de amostras clínicas de humanos (BAOSHAN et al., 2021; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997) e animais (GWIDA et al., 2016; SELIM et al., 2019; WARETH et al., 2015B), mesmo quando existe um baixo número de organismos (HULL et al., 2018), combinando velocidade, sensibilidade, alta especificidade (com uso de sonda), segurança laboratorial e baixo risco de contaminação cruzada ou contaminação por amplicon

(CORBEL, 2006). A aplicação da técnica de qPCR pode suportar as desvantagens dos métodos indiretos e a baixa sensibilidade da técnica de isolamento microbiano.

Embora não haja dados disponíveis significativos sobre a prevalência de brucelose em humanos, o aumento da brucelose em reservatórios animais cria um risco importante de transmissão zoonótica. Desta forma, o Programa de Controle e Prevenção da Brucelose Bovina na Colômbia foi realizado para detectar animais positivos por métodos indiretos, combinados com estratégias de erradicação e vacinação obrigatória (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2020a). Os dados oficiais mais recentes, relacionados à prevalência de brucelose na Colômbia, foram obtidos do Instituto Agropecuário Colombiano (ICA) em 2016. Durante esse ano, foram estudados 262.162 soros de bovinos em 17.345 fazendas, estabelecendo uma prevalência de brucelose de 3,5% e 17,0%, respectivamente (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2016).

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência molecular de *Brucella* spp. e explicar por modelos logísticos de regressão os fatores associados a presença de *Brucella*-DNA, em relação aos animais e aos rebanhos da região leiteira proeminente da Colômbia. Além disso, o estudo teve como foco comparar a capacidade de detecção de DNA de *Brucella* spp. pela qPCR, baseada em sonda em relação a detecção de anticorpos contra *Brucella* spp. por testes sorológicos e, finalmente, diferenciar as cepas vacinais de cepas de campo por um ensaio baseado em SNP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estudo epidemiológico

Foi realizado um estudo epidemiológico observacional, do tipo transversal, com técnicas quantitativas e um questionário epidemiológico fechado, com informações que foram utilizadas para identificar fatores associados a presença de *Brucella* spp nos bovinos da região de estudo.

2.2. Amostragem e população-alvo

O procedimento de amostragem aplicou a fórmula $n = 1,962 p (1 - p)/d^2$ para calcular o tamanho da amostra, com nível de confiança de 95%, precisão absoluta desejada (d^2) de 5% e uma prevalência esperada (p) de 10% baseada na literatura e sendo condizente com a capacidade financeira e operacional do estudo (THRUSFIELD, 2007). Um total de 656 amostras de sangue total foram coletadas aleatoriamente de vacas em 40 rebanhos leiteiros de quatro municípios do norte de Antioquia. Além disso, foi usada uma amostragem proporcional de cada cidade para garantir que o gado leiteiro não estivesse sub-representado.

A população alvo foi composta por animais em lactação ou no período seco, ≥ 2 anos de idade, vacinados na idade regulamentar. A vacinação obrigatória foi verificada pelos registros oficiais de vacinação (RUV) (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2017). A seleção dos rebanhos e animais foi feita como foi descrito no capítulo I. Os animais escolhidos aleatoriamente foram transferidos para uma área de manejo designada, dentro de cada granja, para a coleta das amostras. A área da pele do animal foi limpa com clorexidina 5%, e seis mililitros de sangue venoso caudal foi retirado de cada animal, usando tubos de coleta de sangue com EDTA, um anticoagulante. As amostras de sangue foram refrigeradas e adequadamente transportadas para o laboratório Tesmol na Colômbia para à extração do DNA.

2.3. Coleta de dados epidemiológicos

Os produtores de leite foram convidados a responder a um questionário (Anexo B e C). O questionário foi baseado em revisão de literatura, incluindo perguntas fechadas sobre o manejo dos bovinos, parâmetros zootécnicos e práticas sanitárias como variáveis independentes (Tabelas 8 e 9). O questionário foi pré-testado e validado por produtores de fazendas não pertencentes ao estudo.

2.4. Extração de DNA genômico de amostras

O DNA molde foi obtido com base no protocolo de *Salting* não orgânico, desenvolvido para a recuperação do DNA de amostras de sangue total, descrito anteriormente

(MILLER et al., 1988), com o aprimoramento feito por Queipo-Ortuño et al. (1997) e modificações pelos autores. O sangue total coletado em tubos com EDTA foi suavemente misturado e 0,5 ml de sangue total foi transferido para microtubos estéreis de 1,5 ml contendo 1 ml de solução de lise celular [320 mM de sacarose, cinco mM de MgCl₂, 1% de Triton X-100, dez mM Tris-HCl (pH 7,5)]. Os microtubos foram misturados por inversão, três vezes, e incubados por 10 min à temperatura ambiente. O microtubo foi invertido mais três vezes, durante a incubação e depois centrifugado a 15.000 x g por 2 min (5424 Eppendorf®, Enfield, Connecticut, EUA). O sobrenadante foi descartado sem perder o sedimento celular. O sedimento foi novamente lavado uma vez com uma solução de lise celular e duas vezes com 1 mL de água Milli-Q® ultrapura. Depois que o último sobrenadante foi descartado, o microtubo foi agitado em vórtex para remover o pellet das paredes do tubo. Adicionou-se 400 µl de solução de lise nucleica [60 mM NH₄Cl, 1% de dodecil sulfato de sódio e 24 mM Na₂-EDTA (pH 8,0)] e, lentamente, foi adicionado 5 µl de proteinase K (1 mg/mL). Em seguida, foi incubada por 30 min a 56°C e 500 RPM em agitador de incubadora Vortemp™ 56 (Labnet®, Edison, New Jersey, EUA). Após a digestão, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, então 100 µl de acetato de amônio (7,5 mM) foi adicionado, misturado e centrifugado, a 15.000 x g por 10 min.

O sobrenadante contendo DNA foi cuidadosamente transferido para um microtubo contendo 1 mL de etanol 100% em temperatura ambiente. O tubo foi misturado suavemente até que as fitas de DNA fossem observadas. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 15.000x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado sem perder o sedimento de DNA 1 ml de etanol gelado (70%) foi adicionado para enxaguar o sedimento. O microtubo foi invertido até que o etanol estivesse completamente seco. O DNA foi ressuscitado em 60 µl de solução de DNase e água livre de RNase (RPI®) e incubado a 65°C por 20 min, para melhorar a hidratação e afrouxamento das fitas de DNA.

O DNA extraído foi preservado a -20 °C até as avaliações subsequentes. O processo de extração das amostras foi realizado na Colômbia. O DNA foi transferido para o Brasil para as análises moleculares, com permissão de ambos os governos (Anexo E e F).

2.5. Análise de qualidade

A concentração e a pureza do DNA total foram avaliadas com a utilização do espectrofotômetro Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, EUA). As razões de absorvância A_{260/280} e A_{260/230} foram utilizadas para avaliar a pureza das amostras. A

integridade foi avaliada em gel de agarose 0,8%. O gel foi submetido a corrida eletroforética a 75 volts durante 45 min e subsequentemente corado em brometo de etídio (0,5 mg/mL).

As amostras do DNA foram transportadas para a UFRRJ no Brasil para realização de testes moleculares e genotipagem no Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso do DESP (LASAVE), no Instituto de Veterinária. As amostras extraídas foram ajustadas para uma concentração de 100 ng/uL e três alíquotas foram preservadas em freezer a -20°C até o momento das análises.

2.6. Eficiência, precisão e sensibilidade analítica da qPCR

O DNA total de *B. abortus*, para controle, foi extraído da cepa vacinal B19. O DNA foi quantificado por fluorimetria e a concentração foi utilizada para calcular o número de cópias do genoma de *B. abortus*., para a determinação do número de cópias de cada ponto de diluição, com a utilização da equação: Número de cópias = $6,02 \times 10^{23}$ (cópias por mol) x concentração de DNA (g) / tamanho do genoma de *B. abortus* (pares de bases) x 660 (g/mol/pb). A curva padrão foi construída com sete diluições decimais em série do DNA do controle purificado (de 10^6 a 10^0 cópias). A eficiência da reação foi determinada de acordo com a equação qPCR Efficiency, $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$ (SVEC et al., 2015).

2.7. Detecção molecular de *Brucella* spp.

Todas as amostras foram testadas em duplicata e, se apenas uma das amostras fosse positiva, eram testadas novamente. O DNA extraído de sangue bovino acrescentado com a cepa vacinal *Brucella abortus* B19 (Vecol S.A, Colômbia) foi usado como controle positivo em todos os ensaios moleculares. A extração do controle positivo foi realizada anteriormente aos processos de extração da amostra. O controle positivo interno exógeno TaqMan™ (IPC) (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado para identificar as amostras com a presença de inibidores. Dois controles negativos foram utilizados: o primeiro continha todos os elementos do mix de reação e água livre de nuclease (RPI®) no lugar do DNA molde enriquecido; o segundo continha todos os elementos do mix de reação mais o DNA de um bovino negativo para *Brucella* sp.

Uma sequência específica para o gênero *Brucella* foi escolhida a partir da região conservada do gene *bcs31*, que codifica a proteína de membrana imunogênica BCSP31 de 31 kDa (GenBank: M20404.1) (BRICKER et al., 1988). Os iniciadores: *bcs31*-Forward (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') e *bcs31*-Reverso (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3') desenhados por Bailey et al. (1992), foram escolhidos para os ensaios qPCR (BAILY et al., 1992). Esses iniciadores amplificam 224 pb do gene

bcs31. Além disso, foi utilizada uma sonda de hidrólise (5'-CCGGTGCCGTTATAGGCCCAATAGG-3'), com fluorescência duplamente marcada na extremidade 5', com 6-carboxifluoresceína fosforamida (FAM) como corante repórter, e na extremidade 3' foi marcada com 5-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) como quencher, para melhorar a especificidade (SOHN et al., 2003).

Os *primers* e a sonda foram verificados quanto à especificidade no software *Primer-Blast* disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Os *primers* também foram testados no software Oligo Explorer 1.2 (Hawthorne, NY, EUA) para determinar a temperatura de hibridização, quantidade de Guanina-Citosina (%), *loops* de *primer* e formação de dímeros de *primer*. Um ensaio interno foi realizado para determinar a melhor temperatura de anelamento em um gradiente-PCR, aumentando a temperatura em 1 grau de 58°C para 65°C.

Para obter a sensibilidade máxima do ensaio e descartar a possível presença de dímeros de *primers* e outros produtos não específicos, as concentrações ideais de *primer* foram determinadas testando nove combinações diferentes de concentração destes iniciadores (Forward-Reverse: 0,3-0,3 µM; 0,4-0,4 µM; 0,5-0,5 µM; 0,3-0,4 µM; 0,3-0,5 µM; 0,4-0,3 µM; 0,4-0,5 µM; 0,5-0,3 µM; 0,5-0,4 µM).

Diferentes concentrações de sonda foram testadas para determinar o melhor desempenho, com variação de 0,2 µM a 0,4 µM, em ensaios qPCR com a concentração otimizada de *primers* e um baixo limite de detecção do DNA alvo (10^2 cópias de amostra extraída da vacina de *B. abortus*).

A quantidade apropriada do DNA molde a ser aplicadas no ensaio molecular foi determinada mediante a um ensaio molecular. A concentração do DNA variou de 10,4 a 31,3 ng/µL. O volume de DNA molde apropriado para ser adicionado ao mix de reação, sem criar a inibição de amplificação, foi de 10,4 ng/µL. O IPC não revelou potenciais inibidores no DNA amplificado.

As reações dos ensaios de otimização foram realizadas no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Delaware, EUA) com um volume total de 12 µl, contendo 1x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e aproximadamente 10^2 cópias da cepa *Brucella abortus* B19 como molde de DNA, completando o volume da reação com água de grau molecular (RPI®). As condições da qPCR foram descritas anteriormente (QUEIPO-ORTUNO et al., 2005), mas com modificações na temperatura anelamento. Uma análise da curva de *melting* foi realizada após

o protocolo de amplificação no sinal verde, de 60 - 95°C, com aumento de 0,3°C/seg. Ao final da reação o pico gerado pela curva de *melting* representou a especificidade da amplificação. Uma curva de dissociação única foi produzida para confirmar que o sinal da fluorescência detectado provém somente do amplicon alvo. O IPC não revelou potenciais inibidores na amplificação do DNA molde.

As reações de qPCR foram feitas no *StepOne-Plus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Thermo Scientific, EUA) num volume total de 12 µL, com água de grau molecular (RPI®), 1x Mix QuantiNova™ Sonda PCR Master e Rox (Qiagen®, Alemanha), 0,4 µM de cada Primer, 0,2 µM de sonda TaqMan, 1X de Exo IPC Mix, 1X de Exo IPC DNA e aproximadamente 125 ng de DNA genômico. As condições de termociclagem foram realizadas da seguinte forma: uma manutenção a 95 °C por 2 min, seguida de 45 ciclos compostos de desnaturação a 95 °C por 5 s e anelamento/extensão a 62 °C por 10 s. Todos os processos de biossegurança laboratorial e fluxo unidirecional foram aplicados para evitar contaminação (RICHARDSON et al., 2009). Foi utilizado o processamento cego da amostra, atribuindo um código a cada amostra para evitar um potencial viés do observador.

2.8. Diferenciação de cepas de campo de *Brucella* spp. da cepa vacinal RB51

O ensaio qPCR previamente desenvolvido por Gopaul et al. (2010) foi usado para diferenciar as cepas de campo da cepa vacinal RB51 através de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) da *Brucella* spp. Tratasse de um ensaio de competição usando duas sondas marcadas de formas diferentes, visando a sequência “específica da espécie” ou “não específica”. Dependendo da presença ou ausência do SNP alvo, uma sonda é clivada de em relação a outra, gerando um aumento na fluorescência do corante do oligonucleotídeo.

Selecionamos um único SNP, A667→C667 em BAB1_0649, para diferenciar a cepa de *Brucella* vacinal RB51 das cepas de campo. Este SNP foi previamente identificado por comparação do genoma da RB51 com as sequências de *B. abortus* cepa 2308, *B. abortus* cepa 9-941, *B. melitensis* cepa 16 M, *B. ovis* ATCC 25840 e *B. suis* cepa 1330. Para confirmar a especificidade do alvo para RB51, foram sequenciados os locus em 68 cepas de *B. abortus* correspondentes aos membros de todos os 28 tipos de análise de sequência multilocus identificados nesta espécie até o momento e 26 outras cepas de *Brucella* representando membros de todas as outras espécies e biovars (GOPAUL et al., 2010, 2008; WHATMORE et al., 2007).

Os iniciadores utilizados foram: BAB1_0649-F TGCTGGTTGGCAAGGAAGAG e BAB1_0649-R CGATCAACGCGCCTTCTG desenhados por GOPAUL et al. (2010). O

ensaio foi configurado com um mix de reação de 12 μ L compreendendo 1X de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Delaware, EUA), 0,8 μ M de cada Primer 0,3 μ M de sonda TaqMan e aproximadamente 125 ng do DNA total. As reações foram executadas em um sistema de PCR em tempo real StepOne-Plus™ (Applied Biosystems, Thermo Scientific, EUA) usando condições de termociclagem de manutenção a 95 °C por 10 min seguido por 50 ciclos compostos de desnaturação 92 °C por 15 s e anelamento/extensão 60°C por 1 min.

2.9. Sequenciamento

As amostras positivas foram purificadas e sequenciadas para o gene *bcspl* pelo método Sanger (SANGER et al., 1977). O algoritmo BLAST disponível em (<http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) foi utilizado para avaliar a identidade das sequências fornecidas pelo sequenciamento, com o critério de 99% de identidade, 98% de cobertura e e-value de e^{-10} para definição em nível de espécie.

2.10. Definição de caso

No nível animal, a definição de caso positivo foram vacas de leite ≥ 2 anos de idade com um valor de ciclo de quantificação (Cq) duplicado, menor que 40 ciclos. Um rebanho foi classificado como positivo se pelo menos uma vaca fora positiva.

2.11. Análise espacial

Para a análise espacial, os locais em que as amostras apresentaram positividade na qPCR, foram plotados no mapa com a utilização da ferramenta Intersec, apresentando um símbolo com um tamanho proporcional ao número de casos positivos de cada fazenda leiteira, a fim de determinar as áreas de maior risco. A metodologia empregada nesta análise foi a mesma descrita no capítulo I para amostras positivas na qPCR, determinando a distância das áreas positivas das estradas (distância de ≤ 200 m, $>200-1.000$ m, >1.000 m), bem como os locais de maior influência da doença.

2.12. Análise estatística

Os dados epidemiológicos foram analisados por meio do programa estatístico IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v. 25.0 for Windows (Armonk, Nueva York: IBM Corp.).

A estatística Kappa de Cohen calculou a concordância entre os métodos sorológicos e moleculares (Tabela 8). O valor da área sob a curva (AUC) foi calculado com o método empírico (não paramétrico) descrito por DeLong et al. (1988), somando a área dos trapézios que se formam abaixo dos pontos conectados e que compõem a curva ROC.

O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para variáveis quantitativas com a suposição de normalidade. A correlação de Spearman foi aplicada para as variáveis quantitativas que não atenderam o teste de normalidade. Na análise bivariada, um teste do qui-quadrado ou teste de Fisher foi utilizado para variáveis qualitativas, para avaliar a associação entre a presença de *Brucella*-DNA com todas as variáveis explicativas. As variáveis estatisticamente significativas e aquelas com valor de $p < 0,25$ foram oferecidas aos modelos de regressão logística de animais individuais e a em relação ao rebanho (LONDOÑO, 2010), baixo o método *forward "wald"*, descrito no capítulo I. Antes de criar o modelo final, a multicolinearidade foi medida pela determinação dos fatores de inflação de variância (VIF) e tolerância. A colinearidade foi considerada, em relação ao valor de VIF, maior que 6,0 e a tolerância foi menor que 0,2. De acordo com a revisão da literatura, quando duas variáveis com alta colinearidade são encontradas, apenas a variável com maior importância biológica e plausibilidade será incluída no modelo. Por fim, os coeficientes foram estimados e a adequação, validade e utilidade do modelo foram identificadas.

2.13. Declaração de ética

O protocolo do estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (Aprovação CEP nº 1.243/18) da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRJ) (Anexo D). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Comitê para Uso Animal (Aprovação CICUA número AE-028/ Acta 043301120) da Universidade CES.

3. RESULTADOS

O protocolo manual de extração do DNA apresentou uma concentração média de $125,5 \pm 77,60$ ng/ μ L e pureza média de $1,6 \pm 0,11$ (Figura 7). A verificação da integridade no gel mostrou um apropriado DNA molde (Figura 8). Primers-BLAST foi realizado para determinar a especificidade para o gene alvo dos iniciadores e sonda. Não foram encontradas correspondências significativas com outro gênero bacteriano.

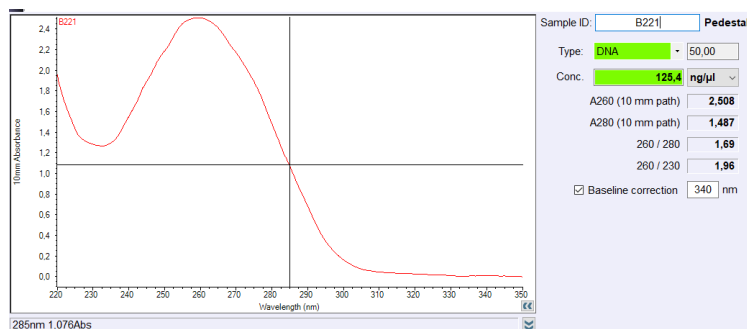


Figura 7. Avaliação ótima da concentração e a pureza da extração do DNA a partir de sangue total com espectrofotômetro Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, EUA).

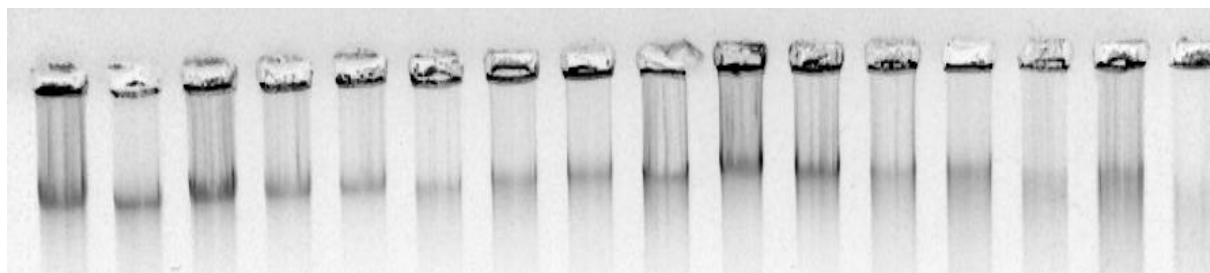


Figura 8. Avaliação da integridade do DNA em gel de agarose 0,8%.

O volume de DNA ideal para adicionar à mistura de reação sem criar a inibição da amplificação foi de 1 μ l. A temperatura ideal de recozimento no qPCR foi de 62°C. O IPC não revelou potenciais inibidores na amplificação do DNA. A duração total do ensaio qPCR foi de 32 minutos.

Para a curva padrão sem DNA bovino, a análise de sensibilidade analítica de qPCR mostrou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99, e os valores de C_q variaram de $18,24 \pm 0,03$ ciclos no primeiro ponto de diluição (10^6) para $38,22 \pm 0,24$ ciclos no último ponto de diluição (1 cópia). Assim, alcançou-se uma eficiência de 99,13% com inclinação de -3,34. Para a curva padrão com DNA bovino, a análise de sensibilidade analítica da qPCR mostrou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99, e os valores de C_q variaram de $18,86 \pm 0,05$ ciclos no primeiro ponto de diluição (10^6) a $39,54 \pm 0,35$ ciclos no último ponto de diluição (1 cópia). Foi alcançada uma eficiência de 96,06% com inclinação de -3,42 (Figura 9).

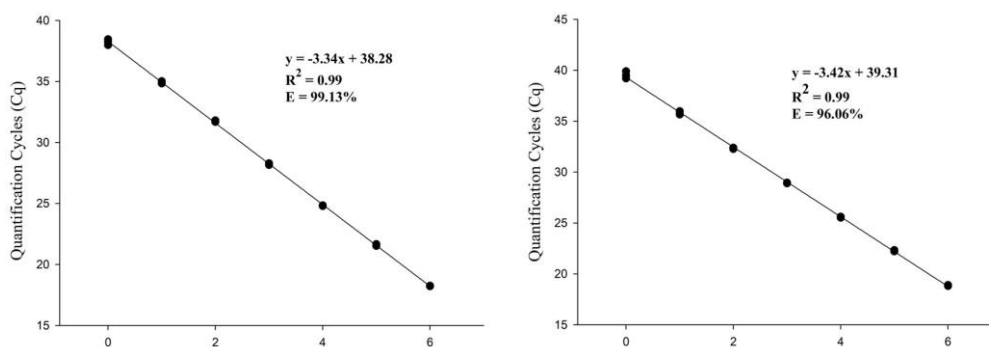


Figura 9. Curva padrão sem DNA, à direita e com DNA bovino, à esquerda.

A soropositividade do rebanho para anticorpos de *Brucella* spp. foi de 27,5% (n=11/40; IC 95%: 14,6, 43,9) e *Brucella*-DNA 62,5% (n=25/40; IC 95%: 45,8, 77,3) por qPCR. Todos os rebanhos positivos por sorologia foram positivos por qPCR, mas nem todos os positivos por qPCR foram positivos por sorologia. Em relação aos animais, o qPCR evidenciou um número significativo de amostras positivas 9,5% (n=62/656; IC 95%: 7,3, 12,0), em contraste com o teste sorológico que foi de apenas 6,6% (n=43/656; IC 95%: 4,8, 8,7). Um total de 37 amostras de sangue que não foram positivas em RBT foram consideradas positivas na qPCR, bem como 41 amostras de sangue que não foram positivas em ambos os testes confirmatórios FPA e cELISA foram consideradas positivas na qPCR (Figura 10)). A análise Kappa de Cohen mostrou uma baixa concordância entre qPCR e sorologia (Tabela 8). A acurácia diagnóstica da qPCR pela área sob a curva ROC teve desempenho com AUC igual a 0,75 (IC 95%: 0,65, 0,84). O ponto de corte ideal foi de 30,34 Cq, onde atingiu 53,5% de sensibilidade, 93,3% de especificidade e taxa de falso-positivo (1-especificidade) igual a 6,7% (Figura 11).

O valor médio de Cq para as amostras positivas foi de 35,54±2,1 ciclos. O ensaio baseado em SNP descartou que a positividade ocorreu pela cepa vacinal RB51 e confirmou que todas as amostras positivas eram de *Brucella* spp. cepas de campo.

Tabela 8. Análise de concordância utilizando a estatística de Kappa de Cohen entre qPCR e testes sorológicos seriados (RBT e cELISA).

qPCR	Kappa	SE	Z	p-value	IC 95%
RBT	0.34	0.057	8.723	0.0001	0.23, 0.45
cELISA	0.40	0.063	10.423	0.0001	0.27, 0.52

SE: erro padrão, Z: é o Z-score para testar o teste de hipótese desenhado, p-valor: probabilidade de estar incorrendo no erro do tipo 1; IC de 95%: intervalo com 95% de confiança

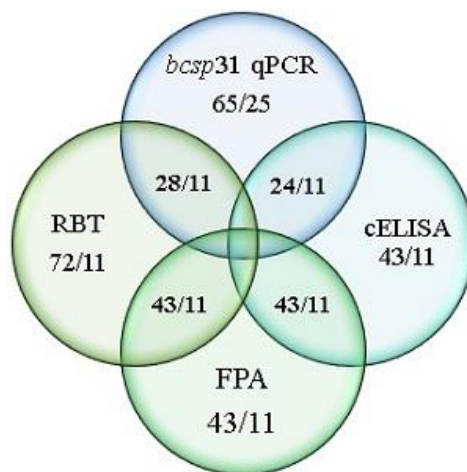


Figura 10. Diagrama de Venn mostrando a concordância entre os testes sorológicos seriados (RBT, FPA e cELISA) e os resultados do *bcp31* qPCR (amostras de sangue de bovino/ rebanho).

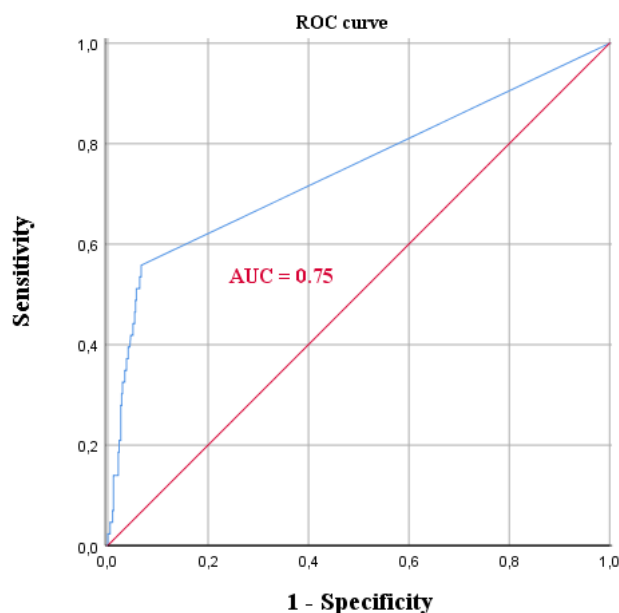


Figura 11. Gráfico da curva ROC da taxa de verdadeiros positivos versus a taxa de falsos positivos para todos os valores de corte possíveis

A análise descritiva demonstrou que a idade média das vacas avaliadas foi de $59,2 \pm 24,6$ meses. A idade gestacional média foi de $81,3 \pm 84,5$ dias e a média do número de gestações foi de $3,0 \pm 1,9$. Foi observado que 84,9% ($n=557$) das vacas testadas estavam no ciclo de lactação e 15,1% ($n=99$) no ciclo seco.

As variáveis quantitativas que não atenderam a normalidade e não foram estatisticamente significativas pela correlação de *Spearman*, foram transformadas em variáveis ordinais no modelo. A análise bivariada, em relação aos animais, mostrou que as variáveis como dias de gestação (p 0,028), históricos de problemas reprodutivos (p 0,004; OR 4,06 IC 95%: 1,45-11,39), uso de touro ou ambos (IA, touro) (p 0,001), tipo de ordenha (p 0,007), tamanho do

rebanho (p 0,018; OR 2,11; IC 95%: 1,12-3,96), densidade de pastejo (p 0,007; OR 2,07; IC 95%: 1,21-3,55), status de brucelose (p 0,005), distância da estrada principal (p 0,000; OR 2,69; IC 95% 1,58-4,57) (Figura 12) foram variáveis estatisticamente significativas com a presença de *Brucella*-DNA ($p < 0,05$) (Tabela 9). Em relação ao rebanho, os históricos de problemas reprodutivos (p 0,036; OR 7,67; IC 95%: 1,30-45,29) e distância da estrada principal (p 0,001; OR 2,15; IC 95%: 1,45-3,20) foram variáveis estatisticamente significativas com presença de *Brucella*-DNA (p -valor $< 0,05$) (Tabela 10). Todas as variáveis estatisticamente significativas e aquelas com valor de $p < 0,25$, mas consideradas críticas para a brucelose bovina, foram oferecidas aos modelos (LONDOÑO, 2010) (Tabelas 11).

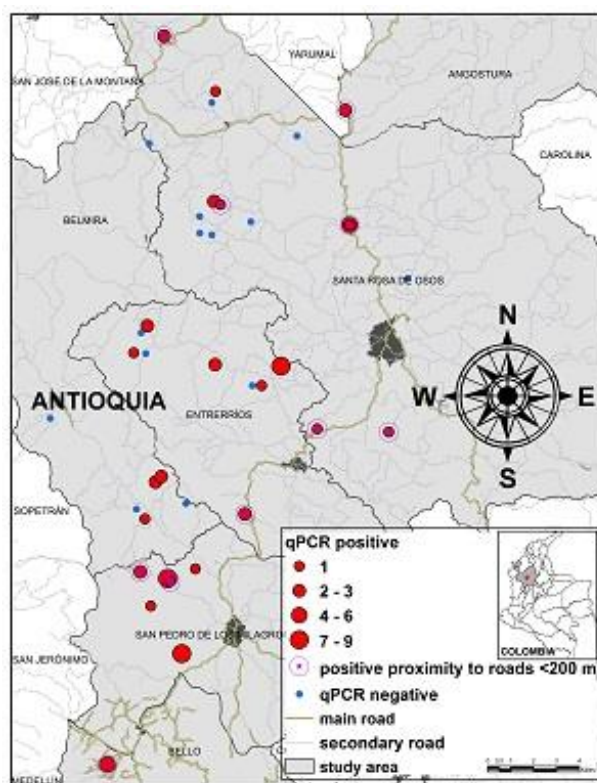


Figura 12. Distribuição espacial da presença de *Brucella*-DNA nos rebanhos próximos das principais estradas e número de vacas positivas por qPCR na região leiteira de Antioquia, Colômbia.

Tabela 9. Distribuições das frequências e análise bivariada de respostas dicotômicas a das perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.

Variável	Frequência	Em relação aos animais = 656			
		%	χ^2	p^{**}	OR (IC 95%)
Idade			1.112	0.573	
24-36 meses	11/150	17.7			
37-60 meses	25/258	40.3			
>60 meses	26/248	41.9			

Dias de gestação			7.176	0.028	
Não gestante	18/257	29.0			
1-90 dias	22/147	35.5			
>90 dias	22/252	35.5			
Condição reprodutiva			2.957	0.085	1.64 (0.93, 2.91)
Gestante	44/399	71.0			
Não gestante	18/257	29.0			
Ciclo de lactação			0.580	0.810	0.916 (0.45, 1.87)
Período de lactação	52/557	83.9			
Período seco	10/99	16.1			
Status de brucelose			10.726	0.005	
Status positivo	25/157	40.3			
Status livre de brucelose	17/264	27.4			
Status desconhecido	20/235	32.3			
Tipo de cepas vacinais			4.708	0.195	
Cepa RB51	3/60	4.8			
Cepa B19	39/453	62.9			
Ambas as cepas	10/99	16.1			
Sem vacinação	10/59	16.1			
Criação de bezerros na fazenda			5.009	0.025	2.34 (1.09, 5.03)
Não	54/495	87.1			
Sim	8/161	12.9			
Procedência dos animais			1.213	0.545	
Compra	22/196	35.5			
Transferência	7/93	11.3			
Nascimento	33/367	53.2			
Históricos de problemas reprodutivos			8.227	0.004	4.06 (1.45, 11.39)
Sim	58/522	93.5			
Não	4/134	6.5			
Aborto			0.271	0.603	1.25 (0.54, 2.87)
Sim	7/62	11.3			
Não	55/594	88.7			
Nascimentos Bezerros fracos			1.320	0.242	2.44 (0.51, 11.761)
Sim	2/10	3.2		<i>F</i>	
Não	60/646	96.8			
Retenção placentária			0.018	1.00	0.87 (0.11, 6.84)
Sim	1/12	1.6		<i>F</i>	
Não	61/644	98.4			
Curral de maternidade			0.614	0.433	1.24 (0.72, 2.13)
Não	39/382	62.9			
Sim	23/274	37.1			
Métodos de reprodução			13.300	0.001	
IA e Touro	31/207	50.0			
IA	8/186	12.9			
Touro	23/263	37.1			
Tipo de ordenha			10.061	0.007	
Piquete, ordenha manual	7/67	11.3			
Piquete, ordenha mecânica	12/247	19.4			
Sala, ordenha mecânica	43/342	69.4			
Tamanho do rebanho			5.575	0.018	2.11 (1.12, 3.96)
> 50 animais	52/439	80			
≤ 50 animais	13/217	20			
Densidade de pastejo			7.370	0.007	2.076 (1.21, 3.55)

≥ 3.5 AU	38/295	61.3			
< 3.5 AU	24/361	38.7			
Proximidade a estrada principal			14.216	0.000	2.69 (1.58, 4.57)
≤ 200 m	31/191	50.0			
> 200 m	31/464	50.0			

%; percentagem de positivos; *p*-valor < 0,05: estatisticamente significativo; OR: razão de chances; IC de 95%: intervalo com 95% de confiança.

Tabela 10. Distribuições da frequência e análise bivariada de respostas politômicas a perguntas da pesquisa sobre práticas de manejo relacionadas à epidemiologia da brucelose. Os dados foram coletados de 656 animais em 40 rebanhos de gado leiteiro localizados em quatro municípios do norte de Antioquia, Colômbia.

Em relação ao rebanho = 40					
Variável	Frequência	%	χ^2	<i>p</i>**	OR (IC 95%)
Status de Brucelose			0.444	0.801	
Status livre de brucelose	9/16	36.0			
Status desconhecido	10/15	40.0			
Status positivo	6/9	24.0			
Tipo de cepas vacinais			2.336	0.506	
Ambas as cepas	2/4	8.0			
Cepa RB51	18/29	72.0			
Cepa B19	2/4	8.0			
Sem vacinação	3/3	12.0			
Criação de bezerros na fazenda			1.881	0.273	2.67 (0.64, 11.07)
Não	20/29	80.0		<i>F</i>	
Sim	5/11	20.0			
Procedência dos animais			1.881	0.273	2.67 (0.642, 11.07)
Compra e/ou transferência de animais.	20/29	80.0		<i>F</i>	
Nascimento	5/11	20.0			
Históricos de problemas reprodutivos			6.000	0.036	7.67 (1.30, 45.29)
Sim	23/32	92.0			
Não	2/8	8.00			
Aborto			0.104	1	1.31 (0.25, 6.88)
Sim	21/33	84.0		<i>F</i>	
Não	4/7	16.0			
Nascimentos de bezerros fracos			4.302	0.060	7.87 (0.88, 70.15)
Sim	9/10	36.0		<i>F</i>	
Não	16/30	64.0			
Retenção placentária			0.064	0.800	1.18 (0.32, 4.42)
Sim	16/25	64.0			
Não	9/15	36.0			
Curral de maternidade			0.064	0.800	1.18 (0.32, 4.42)
Não	16/25	64.0			
Sim	9/15	36.0			
Métodos de reprodução			4.397	0.111	
IA e Touro	10/12	40.0			
IA	4/10	16.0			
Touro	11/18	44.0			
Tipo de ordenha			0.924	0.630	
Piquete, ordenha manual	4/5	16.0			
Piquete, ordenha mecânica	9/16	36.0			
Sala, ordenha mecânica	12/19	48.0			
Tamanho do rebanho			0.064	1	0.84 (0.23, 3.15)

> 50 animais	9/15	36.0			
≤ 50 animais	16/25	64.0			
Densidade de pastejo			2.462	0.117	2.98 (0.74, 11.93)
≥ 3.5 AU	13/17	52.0			
< 3.5 AU	12/23	12.0			
Proximidade estrada principal			10.286	0.001	2.15 (1.45, 3.20)
≤ 200 m	12/12	48.0		<i>F</i>	
> 200 m	13/28	52.0			

%; percentagem de positivos; *p*-valor < 0,05: estatisticamente significativo; OR: razão de chances; IC de 95%: intervalo com 95% de confiança.

No modelo de regressão final em relação aos animais, cinco variáveis explicaram 74,2% da associação com a presença de *Brucella*-DNA: o uso de touros para acasalamento (AOR=2,72; IC 95%: 1,11, 6,66), vacas prenhas (AOR=1,86; IC 95%: 1,03, 3,36) registros de problemas reprodutivos (AOR=3,14; IC 95%: 1,09, 8,99), o uso de sala de ordenha (AOR=2,92; IC 95%: 1,62, 5,26), pertencimento a fazendas próximas <200 m da estrada principal (AOR=2,47; IC 95%: 1,39, 4,39). No modelo final de regressão logística, em relação ao rebanho, duas variáveis explicaram 84% da probabilidade de presença de *Brucella*-DNA nos rebanhos: registros de problemas reprodutivos (AOR=7,76; IC 95%: 1,17, 51,56), e o uso de o touro para acasalamento (AOR=6,49; IC 95%: 1,20, 35,12) (Tabela 11)

Tabela 11. Modelo multivariado com potenciais fatores de risco em relação aos animais e ao rebanho para soropositividade de *Brucella* spp. em gado leiteiro de Antioquia, Colômbia.

Fatores	Categoria	Quantidade de animais = 656						Quantidade de rebanhos = 40					
		Frequência	Prevalência (%)	β	S.E (β)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	Frequência	Prevalência (%)	β	S.E (β)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
Históricos de problemas reprodutivos	Sim	58/522	11.1	1.14	0.537	0.03	3.14 (1.09, 8.99)	23/32	72.0	2.05	0.966	0.03	7.76 (1.17, 51.56)
	Não	4/134	3.0					2/8	25.0	ref.			
Touro	Sim	54/470	11.5	1	0.457	0.03	2.72 (1.11, 6.66)	21/30	70.0	1.87	0.861	0.03	6.49 (1.20, 35.12)
	Não	8/156	5.1	ref.				4/10	40.0				
Sala, ordenha mecânica	Sim	43/342	12.6	1.07	0.301	0.00	2.92 (1.62, 5.26)						
	Não	19/314	6.1	ref.									
Vacas prenha	Sim	44/399	11.0	0.62	0.302	0.04	1.86 (1.03, 3.36)						
	Não	18/257	7.0	ref.									
Proximidade estrada principal	Sim	31/191	16.2	0.91	0.293	0.00	2.47 (1.39, 4.39)						
	Não	31/464	6.7	ref.									
Constante				-5.47	0.711	0				-2.5	1.124	0.03	

Variável dependente: animal positivo, resultados dados com β : beta; S.E: erro padrão; OR: razão de chances; IC de 95%: intervalo com 95% de confiança.

(*) O teste de bondade de ajuste Hosmer–Lemeshow mostrou que o modelo se ajustou aos dados ($X^2 = 10.960$, d.f. 8, *p*-value = 0.20)

(**) O teste de bondade de ajuste Hosmer–Lemeshow mostrou que o modelo se ajustou aos dados ($X^2 = 3.76$, d.f. 2, *p*-value = 0.15)

4. DISCUSSAO

Um número maior de amostras positivas para *Brucella* spp. (n= 62) foi obtido por qPCR em comparação ao teste cELISA (n=43). Um alto número de amostras positivas por qPCR em comparação com sorologias foi anteriormente observado em humanos (AL-AJLAN et al., 2011; BADDOUR & ALKHALIFA, 2008; CASAÑAS et al., 2001; MITKA et al., 2007) e em animais (EMBRAPA, 2019; GWIDA ET AL., 2016; HAMDY & AMIN, 2002; SAADAT et al., 2017; WARETH et al., 2015b). A fraca concordância entre os resultados da qPCR e cELISA foi também relatada em outros estudos (MUKHERJEE et al., 2007; SAADAT et al., 2017). Os testes sorológicos têm sido um dos pilares dos programas oficiais de brucelose. No entanto, um único teste sorológico não fornece evidência suficiente do status da infecção (LÓPEZ-GOÑI & MORIYÓN, 2004).

A brucelose é uma doença “deficiente em ferramentas” que ainda não atinge níveis satisfatórios no controle da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). A detecção de anticorpos fornece apenas um diagnóstico provisório, mas também pode haver um período de incubação excepcionalmente longo em alguns animais infectados e, desta forma, os indivíduos podem permanecer sorologicamente negativos por um período considerável após a infecção (CORBEL, 2006). A maioria dos estudos epidemiológicos são baseados nos testes sorológicos para relatar a associação significativa entre fatores ambientais, características intrínsecas dos animais e a brucelose bovina (AHASAN et al., 2017; SELIM et al., 2019). Este estudo epidemiológico avaliou fatores amplamente estabelecidos pela sorologia, mas os associou à presença de DNA de *Brucella* em gado leiteiro usando o ensaio qPCR.

Um aumento incomum no número de bovinos soropositivos durante a vigilância oficial levou à declaração de quarentena para brucelose bovina na principal região leiteira da Colômbia (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUÁRIO, 2018a). Embora a brucelose seja considerada endêmica na América Latina, ainda há necessidade de avaliar a situação epidemiológica regional (WORLD HEALTH ORGANIZATION AND PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). A prevalência muda o tempo todo em países endêmicos (GODFROID et al., 2002), sendo necessário atualizar a análise da situação epidemiológica para implementar estratégias efetivas de controle e prevenção. Este estudo é o primeiro relato molecular, que mostra uma prevalência de *Brucella*-DNA na região, em concordância com o surto declarado, superior aos registros de soroprevalência na região (AVILA-GRANADOS ET AL., 2019; CÁRDENAS ET AL., 2019B; INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2016).

O uso de sangue bovino total como amostra para detecção de *Brucella* spp. pela prova PCR tem sido pouco considerado porque este patógeno pode se replicar em baixa frequência, com períodos de bacteremia baixos e curtos (VRIONI et al., 2008), além disso alguns autores concluem que o sangue total não é uma amostra ideal, devido à presença de inibidores da PCR (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; O'LEARY et al., 2006; TIWARI et al., 2014). No entanto, foi demonstrado que, em condições experimentais, algumas espécies de *Brucella* podem aglutinar e invadir os glóbulos vermelhos e se estabelecer no citoplasma sem se replicar, estabelecendo bacteremia persistente com diferentes cargas bacterianas (ROCHA-GRACIA et al., 2002; VITRY et al., 2014). Um estudo de três pacientes clínicos infectados no recente surto de brucelose na China confirmou que em humanos, a *Brucella* spp. persiste no sangue periférico (BAOSHAN et al., 2021). Em relação aos animais, na região do estudo, foi possível identificar uma alta recuperação de *Brucella*-DNA de sangue bovino, semelhante aos resultados mostrados em um estudo de surto de brucelose bovina no Egito, onde foi obtida uma alta recuperação *Brucella*-DNA de sangue bovino também por qPCR (GWIDA et al., 2016). Parece paradoxal que um ensaio molecular otimizado e testado em humanos, não mantenha o desempenho em bovinos quando aplicado nas mesmas espécies bacterianas. Desta forma, o diagnóstico de brucelose em bovinos continua baseado em testes sorológicos, permitindo que a *Brucella* spp. permaneça persistente nas fazendas e transforme animais falso-negativos em fontes perigosas de infecção para o rebanho.

A presença de *Brucella*-DNA poderia indicar a existência de bactérias viáveis no sangue de bovinos, mas também é possível que a presença de *Brucella*-DNA esteja associada ao derramamento de partículas de bactérias mortas ou ao DNA pertencente a cepa vacinal (VRIONI et al., 2008). A principal vacina utilizada na região estudada foi a cepa RB51. No entanto, a presença da cepa vacinal RB51 no sangue do animal não deve gerar alertas, de acordo com o Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal (APHIS), o RB51 é rapidamente eliminado do sangue periférico dentro de três dias após a vacinação (NATIONAL COUNCIL OF STATE LEGISLATURES, 2018). A informação do APHIS é inconsistente, segundo Gwida et al. (2016), que detectaram um alto número de amostras de sangue positivas para qPCR, cinco meses após a vacinação de rotina com a cepa vacinal RB51. Quase um ano depois, todos os animais foram negativos para qPCR. As autoridades oficiais devem investigar minuciosamente a possibilidade de permanência a longo prazo da cepa vacinal RB51 no sangue periférico. Em nosso estudo, a influência da vacina RB51 foi

descartada em amostras positivas pelo ensaio qPCR baseado em SNP, que identificou todas as amostras positivas como *Brucella abortus*. cepas de campo.

Os animais que: pertenciam a um rebanho maior a 50 animais, eram ordenhados em sala de ordenha ou ordenha mecânica em piquete, com alta densidade de pastejo ($\geq 3,5$ UA) e rebanhos com status soropositivo para brucelose foram associados significativamente com a presença de *Brucella*-DNA. Existem relatos na literatura que atribuíram um maior risco de infecção por *Brucella* spp. em grandes rebanhos, pois existe uma maior facilidade de transmissão gerada pela proximidade dos animais (BUGEZA et al., 2019; DIAS et al., 2009). As práticas de manejo nas fazendas também podem influenciar a disseminação da *Brucella* spp. entre os animais (MORENO, 2014). Dado o baixo número de organismos do patógeno, que podem servir como fonte de contaminação, é necessária uma rápida detecção das cepas do campo com o uso de ferramentas diagnósticas de alta acurácia e um reforço das medidas de biossegurança.

Uma associação significativa foi encontrada com bezerros não criados na fazenda de produção de leite. Dentre alguns grandes rebanhos leiteiros, os bezerros são transferidos para uma propriedade diferente para serem criados, por falta de espaço. Esses animais retornam ao rebanho quando são novilhas. Se manejados corretamente, segregando os animais e isolando-os de outros rebanhos, juntamente com testes apropriados antes de seu retorno, impedirá a introdução de *Brucella* spp. no rebanho (INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, 2020a). No entanto, o transporte de animais será sempre um importante fator de risco para a introdução da brucelose em rebanhos livres da doença. (CÁRDENAS et al., 2019b; CORBEL, 2006). Uma vez que esses animais estão expostos a diferentes práticas de manejo, essa exposição pode favorecer infecções por *Brucella* (CORBEL, 2006; WARETH et al., 2015b).

Poucos estudos de brucelose têm sido realizados com análise espacial, envolvendo variáveis como proximidade de áreas urbanas e rurais. De acordo com a revisão dos autores, nenhum estudo anterior de brucelose em bovinos avaliou a proximidade dos rebanhos das estradas principais. Este estudo encontrou associação entre a proximidade dos rebanhos das estradas principais (≤ 200 m) e a presença de *Brucella*-DNA no modelo de regressão logística em relação aos animais. Fazendas com fácil acesso as ruas principais tendem a ter maior movimentação de compras e transferências de animais, o que predispõe à introdução da doença (CORBEL, 2006; WARETH et al., 2015b).

No modelo de regressão logística, os touros para acasalamento foram associados com a presença de *Brucella*-DNA em relação aos animais e ao rebanho. *Brucella* spp. pode ser encontrada nos testículos e nas glândulas genitais dos machos (JUNQUEIRA JUNIOR et al., 2018) e transmitida por sêmen infectado (CORBEL, 2006). No entanto, diferenças na acidez vaginal, imunidade da mucosa e muco cervical, entre estro e anestro, podem afetar a sobrevivência bacteriana nos órgãos reprodutivos da fêmea (UHRIG et al., 2013). Portanto, é mais provável que a infecção das fêmeas possa ocorrer por contaminação com descargas infectadas (THOMSEN, 1943), introdução de novos touros (CÁRDENAS et al., 2019b) ou compartilhamento de um reprodutor com vizinhos (AHASAN et al., 2017; MUMA et al., 2007). No Parque Nacional de Yellowstone, EUA, um estudo mostrou soroconversão em quatro de oito bisões após inoculação intravaginal com sêmen de bisão misturado com inóculo da cepa B19 e sugeriu a necessidade de mais estudos sobre transmissão venérea em nestes animais (UHRIG et al., 2013). Embora as vias de transmissão sejam consideradas semelhantes em bovinos, experimentos mais antigos não encontraram um papel essencial no uso de touros para acasalamento em relação a transmissão de *Brucella* em vacas (THOMSEN, 1943). Portanto, são necessários estudos atualizados sobre transmissão venérea em bovinos.

É importante considerar que, embora os sinais clássicos da brucelose como aborto, perda fetal e retenção da placenta sejam documentados, a OIE também relatou que a doença é geralmente assintomática em animais jovens e fêmeas não gestantes. As gestações após infecção, geralmente levam a procriação e o aborto pode até estar ausente (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018). Da mesma forma, a bactéria pode se replicar em baixa frequência, levando a uma baixa bacteremia, que é regulada pelo sistema imunológico, evitando a soroconversão, bem como a manifestação clínica (VRIONI et al., 2008). O ensaio qPCR foi capaz de detectar infecções precoces nas quais os principais sintomas podem não estar presentes. Essa característica da qPCR poderia justificar por que esses problemas reprodutivos individuais não foram significativos, mas quando foram relacionados aos históricos de problemas reprodutivos, apresentou associação com a presença de *Brucella*-DNA.

As variáveis como, históricos de problemas reprodutivos, vacas prenhas e utilização de sala de ordenha foram associadas a presença de *Brucella*-DNA em relação aos animais no modelo de regressão logística. Os resultados concordam com um estudo transversal na Etiópia, onde vacas prenhas têm sido associadas com a probabilidade de presença de *Brucella* spp. (HAILESELASSIE et al., 2011). Além disso, um estudo realizado para isolamento e

posterior detecção por PCR em amostras de leite de vacas soronegativas em Bangladesh também mostrou que a prevalência quase dobra em vacas prenhas versus vacas vazias (ISLAM et al., 2018).

5. CONCLUSÃO

Os ensaios de PCR podem ser usados sem isolamento do organismo para complementar os resultados obtidos nos testes sorológicos. Este estudo demonstrou que é possível a recuperação de *Brucella*-DNA de sangue bovino total e considerou o sangue uma amostra clínica de qualidade para detecção do gene que codifica para a proteína BCSP31.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância de escolher um método de extração de DNA adequado e considerar seu impacto na amplificação, uma vez que a apropriada metodologia da extração é estendida ao diagnóstico molecular e, se esses fatores não são considerados, os resultados podem ser errados. Também foi destacado o papel complementar das técnicas de PCR na detecção da doença, proporcionando um teste molecular altamente sensível.

Vários aspectos epidemiológicos obtidos a partir da prevalência molecular evidenciada neste estudo estão em concordância com outros estudos de soroprevalência. No entanto, esta pesquisa destaca associações não consideradas, como o papel do touro na transmissão da brucelose. Sugere também a necessidade de estudos espaciais e modelos de transmissão em diferentes ambientes. A pesquisa também destaca que as práticas de manejo, principalmente associadas à reprodução, podem favorecer a propagação da infecção por *Brucella* spp. dentro e fora dos rebanhos.

Brucella abortus ainda é a cepa prevalente no país. Todas as amostras analisadas foram identificadas como cepas de campo de *B. abortus*, descartando a presença de partículas vacinais da cepa RB51 na situação epidemiológica apresentada na região. Dada a prevalência flutuante da brucelose em áreas endêmicas, estudos epidemiológicos atualizados são necessários para avaliar a dinâmica da doença. Além disso, as medidas estabelecidas de controle e prevenção da doença também devem ser revisadas para verificar sua eficácia e eventuais ajustes necessários.

CONCLUSÃO GERAL

A brucelose pode ter um impacto severo na saúde humana e, por isso é vital o desenvolvimento de estratégias eficazes para prevenir e erradicar a infecção no gado. Programas de vacinação adequados, implementação de medidas preventivas para gerenciar fatores de risco, vigilância permanente com estudos epidemiológicos e o diagnóstico correto de casos suspeitos melhorarão a segurança alimentar e a saúde pública. Fatores proibitivos são provavelmente os custos envolvidos, mas em comparação com as perdas econômicas potenciais causadas por animais com brucelose, esses custos são desprezíveis.

Estudos epidemiológicos requerem um diagnóstico precoce e preciso como base para o sucesso da prevenção e controle da brucelose bovina. O diagnóstico baseado apenas em testes sorológicos, combinado com práticas inadequadas de manejo, permite que a brucelose permaneça nos rebanhos. Nossos resultados mostraram que a qPCR é capaz de detectar infecção por *Brucella* spp. em diferentes estágios, incluindo a possibilidade de recuperar o DNA deste patógeno em amostras de sangue total bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-SHEHADA, M.N. Seroprevalence of *Brucella* species in equids in Jordan. 2009. <https://doi.org/10.1136/vr.165.9.267>
- ACHA, P.N., SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre. *Rev. Esp. Salud Publica* 79, 423–42, 2005. <https://doi.org/10.1590/s1135-57272005000300012>
- ADONE, R., MUSCILLO, M., LA ROSA, G., FRANZIA, M., TARANTINO, M. Antigenic, Immunologic and Genetic Characterization of Rough Strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. *PLoS One* 6, e24073, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024073>
- AHASAN, M.S., RAHMAN, M.S., RAHMAN, A.K.M.A., BERKVENS, D. Bovine and Caprine Brucellosis in Bangladesh: Bayesian evaluation of four serological tests, true prevalence, and associated risk factors in household animals. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1151-1>
- AKHTAR, S., MIRZA, M.A. Rates of seroconversion in the progeny of *Brucella abortus* seropositive and seronegative cattle and buffalo. *Rev. Sci. Tech.* 14, 711–718, 1995. <https://doi.org/10.20506/rst.14.3.861>
- AL-AJLAN, H.H., IBRAHIM, A.S.S., AL-SALAMAH, A.A. Comparison of different PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples. *Polish J. Microbiol.* 60, 27–33, 2011. <https://doi.org/10.33073/pjm-2011-004>
- AL DAHOUK, S., HOFER, E., TOMASO, H., VERGNAUD, G., LE FLÈCHE, P., CLOECKAERT, A., MS, K., AM, W., K, N., HC, S. Intraspecies biodiversity of the genetically homologous species *Brucella microti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1534–1543, 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.06351-11>
- AL DAHOUK, S., KÖHLER, S., OCCHIALINI, A., PILAR JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M., HAMMERL, J.A., EISENBERG, T., VERGNAUD, G., CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M.S., WHATMORE, A.M., MELZER, F., DREES, K.P., FOSTER, J.T., WATTAM, A.R., HOLGER, & SCHOLZ, C. *Brucella spp.* of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. *Nat. Publ. Gr*, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44420>
- AL DAHOUK, S., NÖCKLER, K.,. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis

- therapy. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2011. <https://doi.org/10.1586/eri.11.55>
- AL DAHOUK, S., NÖCKLER, K., SCHOLZ, H.C., PFEFFER, M., NEUBAUER, H., TOMASO, H. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella spp.* *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1464–1470, 2007. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.305>
- AL DAHOUK, S., SPRAGUE, L.D., NEUBAUER, H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *OIE Rev. Sci. Tech.* 32, 177–188, 2013. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2204>
- ALI, S., AKHTER, S., NEUBAUER, H., MELZER, F., KHAN, I., ABATIH, E.N., EL-ADAWY, H., IRFAN, M., MUHAMMAD, A., AKBAR, M.W., UMAR, S., ALI, Q., IQBAL, M.N., MAHMOOD, A., AHMED, H. Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan. *BMC Res. Notes* 10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2394-2>
- ARELLANO-REYNOSO, B., LAPAQUE, N., SALCEDO, S., BRIONES, G., CIOCCHINI, A.E., UGALDE, R., MORENO, E., MORIYÓN, I., GORVEL, J.P. Cyclic β -1,2-glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 6, 618–625, 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1202>
- ARENAS, N., MORENO, V. Estudio económico de la infección por *Brucella abortus* en ganado bovino en la región del Sumapaz, Cundinamarca. *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.* 63, 2016. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62751>
- ARIF, S., HELLER, J., HERNANDEZ-JOVER, M., MCGILL, D.M., THOMSON, P.C. Evaluation of three serological tests for diagnosis of bovine brucellosis in smallholder farms in Pakistan by estimating sensitivity and specificity using Bayesian latent class analysis. *Prev. Vet. Med.* 149, 21–28, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.11.002>
- ARIF, S., THOMSON, P.C., HERNANDEZ-JOVER, M., MCGILL, D.M., WARRIACH, H.M., HAYAT, K., HELLER, J. Bovine brucellosis in Pakistan; an analysis of engagement with risk factors in smallholder farmer settings. *Vet. Med. Sci.*, 2019. <https://doi.org/10.1002/vms3.165>
- ARROYO CARRERA, I., LÓPEZ RODRÍGUEZ, M.J., SAPIÑA, A.M., LÓPEZ LAFUENTE, A., SACRISTÁN, A.R.B. Probable transmission of brucellosis by breast

- milk. *J. Trop. Pediatr.* 52, 380–1, 2006. <https://doi.org/10.1093/tropej/fml029>
- ASHFORD, R., MUCHOWSKI, J., KOYLASS, M., SCHOLZ, H., WHATMORE, A. Application of Whole Genome Sequencing and Pan-Family Multi-Locus Sequence Analysis to Characterize Relationships Within the Family Brucellaceae. *Front. Microbiol.* 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01329>
- ATLURI, V.L., XAVIER, M.N., DE JONG, M.F., DEN HARTIGH, A.B., TSOLIS, R.M. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905>
- AUNE, K., RHYAN, J.C., RUSSELL, R., ROFFE, T.J., CORSO, B. Environmental persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. *J. Wildl. Manage.* 76, 253–261, 2012. <https://doi.org/10.1002/jwmg.274>
- AVILA-GRANADOS, L.M., GARCIA-GONZALEZ, D.G., ZAMBRANO-VARON, J.L., ARENAS-GAMBOA, A.M. Brucellosis in colombia: Current status and challenges in the control of an endemic disease. *Front. Vet. Sci.*, 2019. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00321>
- BADDOUR, M.M., ALKHALIFA, D.H. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can. J. Microbiol.* 54, 352–357, 2008. <https://doi.org/10.1139/W08-017>
- BAILY, G.G., KRAHN, J.B., DRASAR, B.S., STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1992.
- BAOSHAN, L., YINBO, Y., JINGBO, Z., YI, Z., JIANGHUA, Y., DAWEI, C., CHI, M., DONGHAI, Y., BOHAN, Y., RONGNIAN, Z., SHENG, F., JUN, Z., HAN, X., CHEN, Z. Combined nucleic acid assays for diagnosis of A19 vaccine-caused human brucellosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 368–374, 2021. <https://doi.org/10.1111/TBED.13685>
- BARRIONUEVO, P., GIAMBARTOLOMEI, G.H. Inhibition of antigen presentation by *Brucella*: many more than many ways. *Microbes Infect.*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.12.004>
- BECKETT, F.W., MACDIARMID, S.C. The effect of reduced-dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. *Br. Vet. J.* 141, 507–514, 1985. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(85\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0007-1935(85)90046-6)

- BEDOYA, O.D.M., CASSOLI, L.D., ÁNGEL, M.O., CERÓN MUÑOZ, M.F. Characterization of dairy farms with mechanical milking in Antioquia, Colombia. *Livest. Res. Rural Dev.* 30, 2018.
- BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus*-free herds: A review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Vet. Q.* 20, 81–88, 1998. <https://doi.org/10.1080/01652176.1998.9694845>
- BERCOVICH, Z., HAAGSMA, J., TER LAAK, E.A. Use of delayed-type hypersensitivity test to diagnose brucellosis in calves born to infected dams. *Vet. Q.* 12, 231–237, 1990. <https://doi.org/10.1080/01652176.1990.9694270>
- BOERI, E.J., WANKE, M.M., MADARIAGA, M.J., TEIJEIRO, M.L., ELENA, S.A., TRANGONI, M.D. Comparison of four polymerase chain reaction assays for the detection of *Brucella spp.* in clinical samples from dogs. *Vet. World* 11, 201, 2018. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2018.201-208>
- BOSCHIROLI, M.L., OUAHRANI-BETTACHE, S., FOULONGNE, V., MICHAUX-CHARACHON, S., BOURG, G., ALLARDET-SERVENT, A., CAZEVIEILLE, C., LAVIGNE, J.P., LIAUTARD, J.P., RAMUZ, M., O'CALLAGHAN, D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.* 90, 341–348, 2002a. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00219-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00219-5)
- BOSCHIROLI, M.L., OUAHRANI-BETTACHE, S., FOULONGNE, V., MICHAUX-CHARACHON, S., BOURG, G., ALLARDET-SERVENT, A., CAZEVIEILLE, C., LIAUTARD, J.P., RAMUZ, M., O'CALLAGHAN, D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1544–1549, 2002b. <https://doi.org/10.1073/pnas.032514299>
- BREW, S.D., PERRETT, L.L., STACK, J.A., MACMILLAN, A.P., STAUNTON, N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal [1]. *Vet. Rec.*, 1999.
- BRICKER, B.J., TABATABAI, L.B., DEYOE, B.L., MAYFIELD, J.E. Conservation of antigenicity in a 31-kDa *Brucella* protein. *Vet. Microbiol.* 18, 313–325, 1988. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90096-X)
- BRONNER, A., HÉNAUX, V., FORTANÉ, N., HENDRIKX, P., CALAVAS, D. Why do farmers and veterinarians not report all bovine abortions, as requested by the clinical brucellosis surveillance system in France? *BMC Vet. Res.* 10, 93, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-93>

- BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in new zealand and australia. *J. Hyg. (Lond)*. 54, 351–364, 1956. <https://doi.org/10.1017/S0022172400044612>
- BUGEZA, J., MUWONGE, A., MUNYEME, M., LASUBA, P., GODFROID, J., KANKYA, C. Seroprevalence of bovine brucellosis and associated risk factors in Nakasongola district, Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 2073–2076, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1631-6>
- CÁRDENAS, L., AWADA, L., TIZZANI, P., CÁCERES, P., CASAL, J. Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996–2014). *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1280–1290, 2019a. <https://doi.org/10.1111/tbed.13144>
- CÁRDENAS, L., PEÑA, M., MELO, O., CASAL, J. Risk factors for new bovine brucellosis infections in Colombian herds. *BMC Vet. Res.* 15, 81, 2019b. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1825-9>
- CARDOSO, P.G., MACEDO, G.C., AZEVEDO, V., OLIVEIRA, S.C. *Brucella spp* noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact*, 2006. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
- CARMICHAEL, L.E., BRUNER, D.W. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.* 48, 579–92, 1968.
- CASAÑAS, M.C., QUEIPO-ORTUÑO, M.I., RODRIGUEZ-TORRES, A., ORDUÑA, A., COLMENERO, J.D., MORATA, P. Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 127–31, 2001. <https://doi.org/10.1007/pl00011242>
- CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. Brucellosis. *Cent. Food Secur. Public Heal*, 2018. URL <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=brucellosis-human&lang=en> (accessed 2.5.20).
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Third Case of Rifampin/Penicillin-Resistant Strain of RB51 *Brucella* from Consuming Raw Milk. CDC, 2019. URL <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/62370> (accessed 4.25.20).

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Brucellosis Reference Guide: Exposures, Testing and Prevention. 1–35, 2017.
- CHAIN, P.S.G., COMERCI, D.J., TOLMASKY, M.E., LARIMER, F.W., MALFATTI, S.A., VERGEZ, L.M., AGUERO, F., LAND, M.L., UGALDE, R.A., GARCIA, E.,. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic brucellae. *Infect. Immun.* 73, 8353–8361, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005>
- CLOECKAERT, A., VIZCAÍNO, N., PAQUET, J.Y., BOWDEN, R.A., ELZER, P.H. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: Past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 229–247, 2002a. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00211-0)
- CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M.S., GUILLOTEAU, L.A. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine* 20, 1820–2, 2002b. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00035-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00035-x)
- COELHO, A.C., DÍEZ, J.G., COELHO, A.M. Risk Factors for *Brucella spp.* in Domestic and Wild Animals. *IntechOpen. InTech*, 2015. <https://doi.org/10.5772/61325>
- COLOMA-RIVERO, R.F., GÓMEZ, L., ALVAREZ, F., SAITZ, W., DEL CANTO, F., CÉSPEDES, S., VIDAL, R., OÑATE, A.A. The Role of the Flagellar Protein FlgJ in the Virulence of *Brucella abortus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 178, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00178>
- CONTEXTO GANADERO. Fedegán participa en III Foro Internacional Lácteo de Alpina. 2015. URL <https://www.contextoganadero.com/regiones/fedegan-participa-en-iii-foro-internacional-lacteo-de-alpina> (accessed 2.13.20).
- CORBEL, M. Brucellosis in humans and animals Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: An Overview. *Emerg. Infect. Dis.* 1997. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970219>
- CORBEL, M.J., BRINLEY, M.W.J. Clasificación del género *Brucella*: situación presente(**). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1982.
- COSSABOOM, C.M., KHAROD, G.A., SALZER, J.S., TILLER, R. V., CAMPBELL, L.P., WU, K., NEGRÓN, M.E., AYALA, N., EVERT, M.N., RADOWICZ, J., SHUFORD, J., STONECIPHER, S. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 infection and exposures

- associated with raw milk consumption — Wise County, Texas, 2017. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 67, 286–287, 2018. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6709a4>
- CROSS, P.C., EDWARDS, W.H., SCURLOCK, B.M., MAICHAK, E.J., ROGERSON, J.D. Effects of management and climate on elk brucellosis in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Ecol. Appl.* 17, 957–964, 2007. <https://doi.org/10.1890/06-1603>
- CROSS, P.C., HEISEY, D.M., SCURLOCK, B.M., EDWARDS, W.H., EBINGER, M.R., BRENNAN, A. Mapping brucellosis increases relative to elk density using hierarchical bayesian models. *PLoS One* 5, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010322>
- CROSS, P.C., MAICHAK, E.J., BRENNAN, A., SCURLOCK, B.M., HENNINGSEN, J., LUIKART, G.,. An ecological perspective on *Brucella abortus* in the western United States. *OIE Rev. Sci. Tech.* 32, 79–87, 2013. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2184>
- D’ANASTASIO, R., STANISCIA, T., MILIA, M.L., MANZOLI, L., CAPASSO, L. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 139, 149–156, 2011. <https://doi.org/10.1017/S095026881000097X>
- DADAR, M., SHAHALI, Y., WHATMORE, A.M. Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *Int. J. Food Microbiol.*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.009>
- DAWSON, C.E., PERRETT, L.L., STUBBERFIELD, E.J., STACK, J.A., FARRELLY, S.S.J., COOLEY, W.A., DAVISON, N.J., QUINNEY, S. Isolation and characterization of *Brucella* from the lungworms of a harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J. Wildl. Dis.* 44, 237–246, 2008. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.237>
- DE, B.K., STAUFFER, L., KOYLASS, M.S., SHARP, S.E., GEE, J.E., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., VEGA, R., CLARK, T.A., DANESHVAR, M.I., WILKINS, P.P., WHATMORE, A.M. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J. Clin. Microbiol.* 46, 43–49, 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.01494-07>
- DE FIGUEIREDO, P., FICHT, T.A., RICE-FICHT, A., ROSSETTI, C.A., ADAMS, L.G., ADAMS, G. Infectious Disease Theme Issue REVIEW Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of Brucellae Host Interactions. *Am. J. Pathol.* 185, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
- DIAS, R.A., GONÇALVES, V.S.P., FIGUEIREDO, V.C.F., LÔBO, J.R., LIMA, Z.M.B.,

- PAULIN, L.M.S., GUNNEWIEK, M.F.K., AMAKU, M., FERREIRA NETO, J.S., FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 61, 118–125, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000700015>
- DIAZ-APARICIO, E., ARAGON, V., MARIN, C., ALONSO, B., FONT, M., MORENO, E., PEREZ- ORTIZ, S., BLASCO, J.M., DIAZ, R., MORIYON, I. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3136–3141, 1993. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.12.3136-3141.1993>
- DÍAZ, R., CASANOVA, A., ARIZA, J., MORIYÓN, I. The rose Bengal test in human brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000950>
- DOHOO, I.R., MARTIN, S.W., STRYHN, H. Veterinary epidemiologic research. *VER, Inc.*, 2009.
- DORNELES, E., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ARAÚJO, M.S.S., LIMA, G.K., MARTINS-FILHO, O.A., SRIRANGANATHAN, N., LAGE, A.P. T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfhod vaccination and adult RB51 revaccination. *Vaccine* 32, 6034–6038, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.060>
- DORNELES, E.M.S., SANTANA, J.A., ALVES, T.M., PAULETTI, R.B., MOL, J.P.D.S., HEINEMANN, M.B., LAGE, A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16). *BMC Microbiol.* 14, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-186>
- DORNELES, E.M.S., SRIRANGANATHAN, N., LAGE, A.P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet. Res.*, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7>
- DORNELES, J.V., TEIXEIRA, L.A. Mapeamento epistemológico do campo científico da Ciência da Informação no Brasil: publicações indexadas na base de dados SciELO Citation Index no período de 2014 à 2018. *XI EDICI*, 2018. https://doi.org/10.5822/978-1-59726-228-6_3_WATER
- DUCROTOY, M.J., BARDOSH, K.L. How do you get the Rose Bengal Test at the point-of-care to diagnose brucellosis in Africa? The importance of a systems approach. *Acta Trop.*

- 165, 33–39, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.004>
- DUCROTOY, M.J., CONDE-ÁLVAREZ, R., BLASCO, J.M., MORIYÓN, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>
- EDAO, B.M., HAILEGEBREAL, G., BERG, S., ZEWUDE, A., ZELEKE, Y., SORI, T., ALMAW, G., WHATMORE, A.M., AMENI, G., WOOD, J.L.N. Brucellosis in the Addis Ababa dairy cattle: the myths and the realities. *BMC Vet. Res.* 14, 396, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1709-4>
- EISENBERG, T., HAMANN, H.P., KAIM, U., SCHLEZ, K., SEEGER, H., SCHAUERTE, N., MELZER, F., TOMASO, H., SCHOLZ, H.C., KOYLASS, M.S., WHATMORE, A.M., ZSCHÖCK, M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. From frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3753–3755, 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.07509-11>
- EL-SAYED, A., AWAD, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.*, 2018.. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.01.008>
- EL-TRAS, W.F., TAYEL, A.A., ELTHOLTH, M.M., GUITIAN, J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 141, 321–325, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.017>
- EMBRAPA. Identificação de *Brucella* spp. em bovinos com lesões sugestivas de brucelose. *Bol. Pesqui. e Desenvol.* N. 43 Ministério da Agric. Pecuária e Abast. 34, 2019.
- EWALT, D.R., PAYEUR, J.B., MARTIN, B.M., CUMMINS, D.R., MILLER, W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 448–52, 1994. <https://doi.org/10.1177/104063879400600408>
- EWALT, D.R., PAYEUR, J.B., RHYAN, J.C., GEER, P.L. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: A bacteriological, serological, and histological study. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 417–420, 1997. <https://doi.org/10.1177/104063879700900414>
- FAO/WHO/OIE. Electronic Conference on Veterinary Public Health and Control of Zoonoses in Developing Countries, 2001.
- FERNANDEZ-PRADA, C.M., NIKOLICH, M., VEMULAPALLI, R., SRIRANGANATHAN, N., BOYLE, S.M., SCHURIG, G.G., HADFIELD, T.L.,

- HOOVER, D.L. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 69, 4407–4416, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4407-4416.2001>
- FICHT, T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Futur. Microbiol* 5, 859–866, 2010. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>
- FISCHER, D., LORENZ, N., HEUSER, W., KÄMPFER, P., SCHOLZ, H.C., LIERZ, M., Abscesses associated with a *Brucella inopinata* –like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 43, 625–628, 2012. <https://doi.org/10.1638/2011-0005r2.1>
- FONDO NACIONAL DEL GANADO. Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina | Fedegan, 2012. URL <https://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina> (accessed 5.30.21).
- FONTANA, C., CONDE-ÁLVAREZ, R., STÄHLE, J., HOLST, O., IRIARTE, M., ZHAO, Y., ARCE-GORVEL, V., HANNIFFY, S., GORVEL, J.P., MORIYÓN, I., WIDMALM, G. Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *J. Biol. Chem.* 291, 7727–7741, 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701540>
- FOSTER, G., JAHANS, K.L., REID, R.J., ROSS, H.M. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet. Rec.* 138, 583–586, 1996. <https://doi.org/10.1136/vr.138.24.583>
- FOSTER, J.T., BECKSTROM-STERBERG, S.M., PEARSON, T., BECKSTROM-STERBERG, J.S., CHAIN, P.S.G., ROBERTO, F.F., HNATH, J., BRETTIN, T., KEIM, P. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 191, 2864–2870, 2009. <https://doi.org/10.1128/JB.01581-08>
- FRETIN, D., FAUCONNIER, A., KÖHLER, S., HALLING, S., LÉONARD, S., NIJSKENS, C., FEROOZ, J., LESTRATE, P., DELRUE, R.-M., DANESE, I., VANDENHAUTE, J., TIBOR, A., DEBOLLE, X., LETESSON, J.-J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell. Microbiol.* 7, 687–698, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x>
- FUGIER, E., PAPPAS, G., GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: Implications for

- aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev. Mol. Med*, 2007. <https://doi.org/10.1017/S1462399407000543>
- GALL, D., NIELSEN, K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: A review of test performance and cost comparison. *OIE Rev. Sci. Tech*, 2004. <https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1545>
- GARNER, M.M., LAMBOURN, D.M., JEFFRIES, S.J., HALL, P.B., RHYAN, J.C., EWALT, D.R., POLZIN, L.M., CHEVILLE, N.F. Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides lungworms* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 298–303, 1997. <https://doi.org/10.1177/104063879700900311>
- GŁOWACKA, P., ZAKOWSKA, D., NAYLOR, K., NIEMCEWICZ, M., BIELAWSKA-DRÓZD, A. *Brucella* – Virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish J. Microbiol*, 2018. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>
- GODFROID, J. *Brucella* spp. at the wildlife-livestock interface: An evolutionary trajectory through a livestock-to-wildlife “host jump”? *Vet. Sci.* 5, 2018. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030081>
- GODFROID, J., SAEGERMAN, C., WELLEMANS, V., WALRAVENS, K., LETESSON, J.J., TIBOR, A., MC MILLAN, A., SPENCER, S., SANNA, M., BAKKER, D., POUILLOT, R., GARIN-BASTUJI, B. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Vet. Microbiol.* 90, 461–477, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)
- GONZÁLEZ, D., GRILLÓ, M.J., DE MIGUEL, M.J., ALI, T., ARCE-GORVEL, V., DELRUE, R.M., CONDE-ÁLVAREZ, R., MUÑOZ, P., LÓPEZ-GOÑI, I., IRIARTE, M., MARÍN, C.M., WEINTRAUB, A., WIDMALM, G., ZYGMUNT, M., LETESSON, J.J., GORVEL, J.P., BLASCO, J.M., MORIYÓN, I. Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* 3, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760>
- GOPAUL, K.K., KOYLASS, M.S., SMITH, C.J., WHATMORE, A.M. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *BMC Microbiol.* 8, 1–14, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-86/FIGURES/6>

- GOPAUL, K.K., SELLS, J., BRICKER, B.J., CRASTA, O.R., WHATMORE, A.M. Rapid and reliable single nucleotide polymorphism-based differentiation of brucella live vaccine strains from field strains. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1461–1464, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02193-09>
- GORVEL, J.P., MORENO, E. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90, 281–297, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- GREENFIELD, R.A., DREVETS, D.A., MACHADO, L.J., VOSKUHL, G.W., CORNEA, P., BRONZE, M.S. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am. J. Med. Sci.* 323, 299–315, 2002. <https://doi.org/10.1097/00000441-200206000-00003>
- GRILLÓ, M.J., BLASCO, J.M., GORVEL, J.P., MORIYÁN, I., MORENO, E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.* 2012. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- GUDOSHNIK, A.N. Role of pasture ticks and rodents in dissemination of *Brucella*. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 29, 113–7, 1958.
- GUSI, A.M., BERTU, W.J., JESÚS DE MIGUEL, M., DIESTE-PÉREZ, L., SMITS, H.L., OCHOLI, R.A., BLASCO, J.M., MORIYÓN, I., MUÑOZ, P.M. Comparative performance of lateral flow immunochromatography, iELISA and rose Bengal tests for the diagnosis of cattle, sheep, goat and swine brucellosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007509>
- GWIDA, M., EL-ASHKER, M., MELZER, F., EL-DIASTY, M., EL-BESKAWY, M., NEUBAUER, H. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. *Ir. Vet. J.* 69, 3, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0062-9>
- HAAG, A.F., MYKA, K.K., ARNOLD, M.F.F., CARO-HERNÁNDEZ, P., FERGUSON, G.P. Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *Int. J. Microbiol.*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/124509>
- HAILESELASSIE, M., KALAYOU, S., KYULE, M., ASFAHA, M., BELIHU, K. Effect of *Brucella* infection on reproduction conditions of female breeding cattle and its public health significance in Western Tigray, Northern Ethiopia. *Vet. Med. Int.*, 2011.

<https://doi.org/10.4061/2011/354943>

- HALLING, S.M. On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb. Comp. Genomics* 3, 21–29, 1998. <https://doi.org/10.1089/omi.1.1998.3.21>
- HALLING, S.M., PETERSON-BURCH, B.D., BRICKER, B.J., ZUERNER, R.L., QING, Z., LI, L.L., KAPUR, V., ALT, D.P., OLSEN, S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol*, 2005. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005>
- HAMDY, M.E.R., AMIN, A.S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet. J.* 163, 299–305, 2002. <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0681>
- HAMMERL, J.A., GÖLLNER, C., JÄCKEL, C., SCHOLZ, H.C., NÖCKLER, K., REETZ, J., AL DAHOUK, S., HERTWIG, S. Genetic Diversity of *Brucella* Reference and Non-reference Phages and Its Impact on *Brucella*-Typing. *Front. Microbiol.* 8, 408, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00408>
- HASSOUNEH, L., QUADRI, S., RETO, P.P., CHAISAVANEYAKORN, S., CUTRELL, J.B., WETZEL, D.M., NIJHAWAN, A.E. An Outbreak of Brucellosis: An Adult and Pediatric Case Series. *Open Forum Infect. Dis.* 6, ofz384–ofz384, 2019. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFZ384>
- HATCHER, S.M., SHIH, D., HOLDERMAN, J., COSSABOOM, C., LEMAN, R., DEBESS, E. Adverse event associated with unintentional exposure to the *Brucella abortus* rb51 vaccine — Oregon, december 2017. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*, 2018. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6726a4>
- HOLT, H.R., ELTHOLTH, M.M., HEGAZY, Y.M., EL-TRAS, W.F., TAYEL, A.A., GUITIAN, J. *Brucella spp.* infection in large ruminants in an endemic area of Egypt: cross-sectional study investigating seroprevalence, risk factors and livestock owner's knowledge, attitudes and practices (KAPs). *BMC Public Health* 11, 341, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-341>
- HOSSEINI-CHEGENI, A., TAVAKOLI, M., TELMADARRAIY, Z., SEDAGHAT, M.M., FAGHIHI, F. Detection of a *Brucella-like* (Alphaproteobacteria) Bacterium in *Boophilus*

- spp.* (Acari: Ixodidae) from Iran. *J. Med. Microbiol. Infect. Dis.* 5, 66–68, 2017. <https://doi.org/10.29252/jommid.5.3.4.66>
- HOYER, B.H., MCCULLOUGH, N.B. Polynucleotide Homologies of *Brucella* Deoxyribonucleic Acids. *J. Bacteriol.* 95, 444, 1968.
- HUBÁLEK, Z., SCHOLZ, H.C., SEDLÁČEK, I., MELZER, F., SANOGO, Y.O., NESVADBOVÁ, J. Brucellosis of the Common Vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 679–688, 2007. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0143>
- HULL, N., MILLER, J., BERRY, D., LAEGREID, W., SMITH, A., KLINGHAGEN, C., SCHUMAKERA, B. Optimization of *Brucella abortus* protocols for downstream molecular applications. *J. Clin. Microbiol.* 56, 2018. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-17>
- HULL, N.C., SCHUMAKER, B.A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2018. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1500846>
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución No. 075495 de 2020. “Por medio de la cual se establecen las medidas sanitarias para la prevención y control de la *Brucella Abortus* en las especies bovina, bufalina, ovina, caprina, porcina y équida dentro del territorio nacional.” *Inst. Colomb. Agropecu.* 2020a.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Muestreo Nacional de Prevalencia de la Brucelosis Bovina y Zonificación, 2020b. [Manuscrito no publicado].
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución ICA No. 7781 de 2019. *Inst. Colomb. Agropecu.* 2019.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución ICA No. 30392 de 2018. *Inst. Colomb. Agropecu.* 2018a.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2018b. URL <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2017.aspx> (accessed 3.24.20).
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución 7231 de 2017. *Inst. Colomb. Agropecu.* 2017.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Boletín-Sanidad-Animal- ICA 2016. URL

<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/bol/epi/boletines-anauales> (accessed 2.6.20).

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Resolución No. 00550 de 2006 [WWW Document]. *Inst. Colomb. Agropecu.*, 2006.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO,. Resolución ICA 0700 de 2002. *Inst. Colomb. Agropecu.*, 2002. URL http://normograma.invima.gov.co/docs/resolucion_ica_0700_2002.htm (accessed 2.6.20).

IQBAL, Z. Role of ixodid ticks in transmission of bacterial diseases in cattle and buffaloes in Pakistan. *Pak. J. Agri. Sci* 34, 86–88, 1997.

ISLAM, M.S., ISLAM, M.A., KHATUN, M.M., SAHA, S., BASIR, M.S., HASAN, M.-M. Molecular Detection of *Brucella spp.* from Milk of Seronegative Cows from Some Selected Area in Bangladesh. *J. Pathog.* 2018, 1–7, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9378976>

JAYÍ, M., GIRAULT, G., PERROT, L., TAUNAY, B., VUILMET, T., ROSSIGNOL, F., PITEL, P.-H., PICARD, E., PONSART, C., MICK, V. Phenotypic and Molecular Characterization of *Brucella microti-Like* Bacteria From a Domestic Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*). *Front. Vet. Sci.* 5, 283, 2018. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00283>

JIM QUIGLEY. Calf feeding programs and control. *DeLaval Milkproduction.com*, 2005.

JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P., OUAHRANI-BETTACHE, S., QUINTANA, J.F., MITJANA, O., HANNA, N., BESSOLES, S., SANCHEZ, F., SCHOLZ, H.C., LAFONT, V., KÖHLER, S., OCCHIALINI, A. The New Species *Brucella microti* Replicates in Macrophages and Causes Death in Murine Models of Infection. *J. Infect. Dis.* 202, 3–10, 2010. <https://doi.org/10.1086/653084>

JUNQUEIRA JUNIOR, D.G., LIMA, A.M.C., ROSINHA, G.M.S., CARVALHO, C.E.G., OLIVEIRA, C.E., SANCHES, C.C. Detection of *Brucella abortus* B19 strain DNA in seminal plasma by polymerase chain reaction in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 476–479, 2018. <https://doi.org/10.1111/tbed.12727>

KADEN, R., FERRARI, S., JINNEROT, T., LINDBERG, M., WAHAB, T., LAVANDER, M. *Brucella abortus* determination of survival times and evaluation of methods detection

- in several matrices. *BMC Infect. Dis.* 18, 259, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3134-5>
- KARTHIK, K., RATHORE, R., THOMAS, P., ELAMURUGAN, A., ARUN, T.R., DHAMA, K. Serological and molecular detection of *Brucella abortus* from cattle by RBPT, STAT and PCR and sample suitability of whole blood for PCR. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 9, 262–269, 2014. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.262.269>
- KATO, Y., MASUDA, G., ITODA, I., IMAMURA, A., AJISAWA, A., NEGISHI, M. Brucellosis in a returned traveler and his wife: Probable person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *J. Travel Med.* 14, 343–345, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2007.00139.x>
- KIMURA, M., UNE, Y., SUZUKI, M., PARKEUN-SIL, IMAOKA, K., MORIKAWA, S. Isolation of *Brucella inopinata*-Like Bacteria from White's and Denny's Tree Frogs. <https://home.liebertpub.com/vbz> 17, 297–302, 2017. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2016.2027>
- KÖHLER, S., FOULONGNE, V., OUAHRANI-BETTACHE, S., BOURG, G., TEYSSIER, J., RAMUZ, M., LIAUTARD, J.P. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15711–15716, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.232454299>
- KÖHLER, S., MICHAUX-CHARACHON, S., PORTE, F., RAMUZ, M., LIAUTARD, J.P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol.* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00078-7)
- LAMONTAGNE, J., FOREST, A., MARAZZO, E., DENIS, F., BUTLER, H., MICHAUD, J.F., BOUCHER, L., PEDRO, I., VILLENEUVE, A., SITNIKOV, D., TRUDEL, K., NASSIF, N., BOUDJELTI, D., TOMAKI, F., CHAVES-OLARTE, E., GUZMÁN-VERRI, C., BRUNET, S., CÔTÉ-MARTIN, A., HUNTER, J., MORENO, E., PARAMITHIOTIS, E. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.* 8, 1594–1609, 2009. <https://doi.org/10.1021/pr800978p>
- LANGWIG, K.E., GOMES, M.G.M., CLARK, M.D., KWITNY, M., YAMADA, S., WARGO, A.R., LIPSITCH, M. Limited available evidence supports theoretical predictions of reduced vaccine efficacy at higher exposure dose. *Sci. Rep.* 9, 1–6, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39698-x>

- LAPAQUE, N., MORIYON, I., MORENO, E., GORVEL, J.P. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003>
- LEAL-KLEVEZAS, D.S., MARTINEZ-VAZQUEZ, I.O., LOPEZ-MERINO, A., MARTINEZ-SORIANO, J.P. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3087–3090, 1995. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.12.3087-3090.1995>
- LECLERCQ, S., CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M.S. Taxonomic Organization of the Family Brucellaceae Based on a Phylogenomic Approach. *Front. Microbiol.* 10, 3083, 2019. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.03083>
- LÉONARD, S., FERROOZ, J., HAINE, V., DANESE, I., FRETIN, D., TIBOR, A., DE WALQUE, S., DE BOLLE, X., LETESSON, J.J. FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J. Bacteriol.* 189, 131–141, 2007. <https://doi.org/10.1128/JB.00712-06>
- LETESSON, J.J., BARBIER, T., ZÚÑIGA-RIPA, A., GODFROID, J., DE BOLLE, X., MORIYÓN, I. *Brucella* genital tropism: What’s on the menu. *Front. Microbiol.*, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00506>
- LETESSON, J.J., LESTRATE, P., DELRUE, R.M., DANESE, I., BELLEFONTAINE, F., FRETIN, D., TAMINIAU, B., TIBOR, A., DRICOT, A., DESCHAMPS, C., HAINE, V., LEONARD, S., LAURENT, T., MERTENS, P., VANDENHAUTE, J., DE BOLLE, X. Fun stories about *Brucella*: The “furtive nasty bug.” *Vet. Microbiol.* 90, 317–328, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00208-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00208-0)
- LONDOÑO, J.L. Metodología de la investigación epidemiológica 4ª ed.. Bogotá: Ed.El Manual Moderno, 2010. 432 p.; 23 cm. Bibliografía: p. 395-409. ISBN 978-958-9446-33-1.
- LOPARDO, H.A., GARRAHAN, J.P., PROFESOR, ", PREDARI, S.C., VAY, C. Manual de microbiología clínica de la asociación Argentina de microbiología volumen I Bacterias de Importancia Clínica. *Editores*, 2017.
- LÓPEZ-GOÑI, I., MORIYÓN, I. *Brucella*: Molecular and Cellular Biology. 2004.

- LOPEZ, A., HITOS, F., PEREZ, A., NAVARRO-FIERRO, R.R. Lung lesions in bovine fetuses aborted by *Brucella abortus*. *Can. J. Comp. Med.* 48, 275–277, 1984.
- LOVERA, R., FERNÁNDEZ, M.S., JACOB, J., LUCERO, N., MORICI, G., BRIHUEGA, B., FARACE, M.I., CARACOSTANTOGOLO, J., CAVIA, R. Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005722, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005722>
- LUCERO, N.E., AYALA, S.M., ESCOBAR, G.J., JACOB, N.R. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136, 496–503, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008795>
- MABLESON, H.E., OKELLO, A., PICOZZI, K., WELBURN, S.C. Neglected Zoonotic Diseases-The Long and Winding Road to Advocacy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002800>
- MAICHAK, E.J., SCURLOCK, B.M., ROGERSON, J.D., MEADOWS, L.L., BARBKNECHT, A.E., EDWARDS, W.H., CROSS, P.C.. Effects of management, behavior, and scavenging on risk of brucellosis transmission in elk of western wyoming. *J. Wildl. Dis.* 45, 398–410, 2009. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.398>
- MANCILLA, M. Smooth to Rough Dissociation in *Brucella*: The Missing Link to Virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 98, 2015. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00098>
- MARSTON, J. Report on Malta Fever. *Army Med. Dep. Med. Rep.* 3, 520–521, 1863. <https://doi.org/10.1136/jramc-111-01-34>
- MARTIROSYAN, A., MORENO, E., GORVEL, J.-P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol. Rev.* 240, 211–234, 2011. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2010.00982.X>
- MATOPE, G., BHEBHE, E., MUMA, J.B., LUND, A., SKJERVE, E. Herd-level factors for *Brucella* seropositivity in cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.* 94, 213–221, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.01.003>
- MAYFIELD, J.E., BRICKER, B.J., GODFREY, H., CROSBY, R.M., KNIGHT, D.J., HAILING, S.M., BALINSKY, D., TABATABAI, L.B. The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene* 63, 1–9, 1988. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90540-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90540-9)

- MCDONALD, W.L., JAMALUDIN, R., MACKERETH, G., HANSEN, M., HUMPHREY, S., SHORT, P., TAYLOR, T., SWINGLER, J., DAWSON, C.E., WHATMORE, A.M., STUBBERFIELD, E., PERRETT, L.L., SIMMONS, G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4363–4370, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.00680-06>
- MCQUISTON, J.R., VEMULAPALLI, R., INZANA, T.J., SCHURIG, G.G., SRIRANGANATHAN, N., FRITZINGER, D., HADFIELD, T.L., WARREN, R.A., SNELLINGS, N., HOOVER, D., HALLING, S.M., BOYLE, S.M. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect. Immun.* 67, 3830–3835, 1999. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3830-3835.1999>
- MILILLO, M.A. Estudio de los mecanismos y componentes de *Brucella abortus* involucrados en la disminución de MHC-I y la respuesta T CD8+ citotóxica. Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires Área de investigación: Farmacia y Bioquímica Subárea de investigación: Ciencias de la Salud Lic. Bioquímica, Buenos Aires, 2018.
- MILIONIS, H., CHRISTOU, L., ELISAF, M. Cutaneous manifestations in brucellosis: Case report and review of the literature. *Infection* 28, 124–126, 2000. <https://doi.org/10.1007/s150100050062>
- MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215, 1988. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- MIRANDA, K.L., POESTER, F.P., DORNELES, E.M.S., RESENDE, T.M., VAZ, A.K., FERRAZ, S.M., LAGE, A.P. *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. *Acta Trop.* 160, 58–61, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.04.012>
- MITKA, S., ANETAKIS, C., SOULIOU, E., DIZA, E., KANSOUZIDOU, A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1211–1218, 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.00010-06>
- MOGOLLÓN, D., RINCÓN, J., VILLALOBOS, R., BOHÓRQUEZ, C., MOSSOS

- CAMPOS, N., ARBELÁEZ RENDÓN, G., JAIRO NAVARRO BAHAMÓN, J. Instrucciones generales para el usuario de los servicios oficiales de diagnóstico veterinario en Colombia. *Instituto Colombiano Agropecuario*, 2003.
- MOLLOY, S. Circular virulence for *Brucella*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1201>
- MONDRAGÓN-LENIS, I.M., VÉLEZ-LONDOÑO, J.D., CALLE, D., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M., CARDONA-CASTRO, N. First confirmed case of human brucellosis by *Brucella melitensis*, a zoonosis present in Colombia. *Infectio* 24, 259–261, 2020. <https://doi.org/10.22354/in.v24i4.886>
- MONREAL, D., GRILLÓ, M., GONZÁLEZ, D., MARÍN, C.M., DE MIGUEL, M., LÓPEZ-GOÑI, I., BLASCO, J., CLOECKAERT, A., MORIYÓN, I. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect. Immun.* 71, 3261–3271, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>
- MORALES-ESTRADA, A.I., HERNÁNDEZ-CASTRO, R., LÓPEZ-MERINO, A., SINGH-BEDI, J., CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility of *Brucella spp.* cultured from cows and goats manure in Mexico. *Arch. Med. Vet.* 48, 231–235, 2016. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2016000200014>
- MORATA, P., QUEIPO-ORTUÑO, M.I., DE DIOS COLMENERO, J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2443–6, 1998.
- MORENO, E. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Mayer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Ver.*, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa045>
- MORENO, E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front. Microbiol.*, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
- MORENO, E. Brucellosis in Central America. *Vet. Microbiol.* 90, 31–38, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00242-0)
- MORENO, E., MORIYÓN, I. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.022622699>

- MORIYÓN, I., GRILLÓ, M.J., MONREAL, D., GONZÁLEZ, D., MARÍN, C., LÓPEZ-GOÑI, I., MAINAR-JAIME, R.C., MORENO, E., BLASCO, J.M. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, 2004. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003037>
- MUKHERJEE, F. Optimization and Validation of a Diagnostic Real-Time PCR for Bovine Brucellosis. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3, 577–587, 2015. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.11.577.587>
- MUKHERJEE, F., JAIN, E., PATEL, V., NAIR, M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *J. Med. Microbiol.* 56, 1309–1316, 2007. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47160-0>
- MUMA, J.B., SAMUI, K.L., OLOYA, J., MUNYEME, M., SKJERVE, E. Risk factors for brucellosis in indigenous cattle reared in livestock-wildlife interface areas of Zambia. *Prev. Vet. Med.* 80, 306–317, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.03.003>
- MUÑOZ, P.M., BLASCO, J.M., ENGEL, B., DE MIGUEL, M.J., MARÍN, C.M., DIESTE, L., MAINAR-JAIME, R.C. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 146, 150–158, 2012. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2012.02.012>
- MUTNAL, M.B., PURWAR, S., METGUD, S.C., NAGMOTI, M.B., PATIL, C.S. PCR confirmation of cutaneous manifestation due to *Brucella melitensis*. *J. Med. Microbiol.* 56, 283–285, 2007. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46927-0>
- NATIONAL COUNCIL OF STATE LEGISLATURES. *Brucella abortus* Strain RB51 Vaccine Licensed for Use in Cattle. *State milk laws*, 2018. <https://doi.org/10.1128/CVI.00326-10>
- NAVARRO, E., ESCRIBANO, J., FERNÁNDEZ, J., SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 147–151, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00616.x>
- NDENGU, M., MATOPE, G., DE GARINE-WICHATITSKY, M., TIVAPASI, M., SCACCHIA, M., BONFINI, B., PFUKENYI, D.M. Seroprevalence of brucellosis in cattle and selected wildlife species at selected livestock/wildlife interface areas of the Gonarezhou National Park, Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.* 146, 158–165, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.08.004>

- NEGRÓN, M.E., KHAROD, G.A., BOWER, W.A., WALKE, H. Notes from the Field: Human *Brucella abortus* RB51 Infections Caused by Consumption of Unpasteurized Domestic Dairy Products — United States, 2017–2019. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68, 185, 2019. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6807a6>
- NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90, 5–9, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00209-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00209-2)
- NIE, J., SUN, G.Q., SUN, X.D., ZHANG, J., WANG, N., WANG, Y.M., SHEN, C.J., HUANG, B.X., JIN, Z. Modeling the transmission dynamics of dairy cattle brucellosis in Jilin province, China. *J. Biol. Syst.* 22, 533–554, 2014. <https://doi.org/10.1142/S021833901450020X>
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90, 447–459, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- NIELSEN, K. Brucellosis en las américas: perspectivas de diagnóstico y de control mediante la utilización de nuevas vacunas. pp. 229–237, 2000.
- NIELSEN, K., SMITH, P., WIDDISON, J., GALL, D., KELLY, L., KELLY, W., NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.* 100, 25–30, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.010>
- NOVIELLO, S., GALLO, R., KELLY, M., LIMBERGER, R.J., DEANGELIS, K., CAIN, L., WALLACE, B., DUMAS, N. Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1848–1850, 2004. <https://doi.org/10.3201/eid1010.040076>
- O'GRADY, D., KENNY, K., POWER, S., EGAN, J., RYAN, F. Detection of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in the faeces of cattle with false positive reactions in serological tests for brucellosis in Ireland. *Vet. J.* 216, 133–135, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.07.016>
- O'LEARY, S., SHEAHAN, M., SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Res. Vet. Sci.* 81, 170–176, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.12.001>
- ÖGREDICI, Ö., ERB, S., LANGER, I., PILO, P., KERNER, A., HAACK, H.G.,

- CATHOMAS, G., DANUSER, J., PAPPAS, G., TARR, P.E. Brucellosis reactivation after 28 years. *Emerg. Infect. Dis*, 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100678>
- OLSEN, S.C., BOGGIATTO, P., WHITE, D.M., MCNUNN, T. Biosafety Concerns Related to *Brucella* and Its Potential Use as a Bioweapon. *Appl. Biosaf.* 23, 77–90, 2018. <https://doi.org/10.1177/1535676018771983>
- OLSEN, S.C., PALMER, M. V. Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years. *Vet. Pathol.* 51, 1076–1089, 2014. <https://doi.org/10.1177/0300985814540545>
- ONUNKWO, J.I., NJOGA, E.O., NJOGA, U.J., EZEOKAFOR, E., OKEZIE EKERE, S. *Brucella* seropositivity in chicken and risk factors for *Brucella* infection at the animal-human interface in Anambra State, Nigeria. *Int. J. One Heal. Available* 4, 28–34, 2018. <https://doi.org/10.14202/IJOH.2018.28-34>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Acceso en línea: OIE - World Organisation for Animal Health. Código Sanit. para los Anim. Acuáticos, 2019. URL <https://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/acceso-en-linea/> (accessed 4.8.20).
- ORTIZ, Á.J. Análisis de Seropositividad de Brucelosis Bovina Mediante Elisa Competitiva y Fluorescencia Polarizada, entre El 1 de Septiembre de 2014 Y 13 de Febrero de 2015 en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Secci, 2015.
- ORTIZ, L.F., MUSKUS, C., SÁNCHEZ, M.M., OLIVERA, M. Identification of *Brucella canis* Group 2 in colombian kennels. *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 25, 615–619, 2012.
- OSTERMAN, B., MORIYÓN, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1173–1175, 2006. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.64349-0>
- OUAHRANI-BETTACHE, S., JIMÉNEZ DE BAGÜÉS, M.P., DE LA GARZA, J., FREDDI, L., BUESO, J.P., LYONNAIS, S., AL DAHOUK, S., DE BIASE, D., KÖHLER, S., OCCHIALINI, A. Lethality of *Brucella microti* in a murine model of infection depends on the wbkE gene involved in O-polysaccharide synthesis. *Virulence*, 2019. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1682762>
- OVIEDO-PASTRANA, M., BRUNAL-TACHACK, E., DORIA-RAMOS, M., OVIEDO-SOCARRAS, T. Analysis of epidemiological indicators: Bovine brucellosis on the

- Atlantic coast and Antioquia - Colombia, 2005-2013. *Rev. MVZ Córdoba* 22, 6034–6043, 2017. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1073>
- PACHECO-MONTEALEGRE, M., PATIÑO, R.E., TORRES, L., JIMÉNEZ, S., RODRÍGUEZ, J.L., CARO-QUINTERO, A. The draft genome of *Brucella abortus* strain Ba col-B012, isolated from a dairy farm in Nariño, Colombia, bring new insights into the epidemiology of biovar 4 strains. *Stand. Genomic Sci.* 12, 89, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0299-2>
- PACHECO, M. Detecção molecular de DNA de *Brucella abortus* em sêmen bovino in natura. *Minas Gerais, MG: Universidade Federal de Uberlândia*, 2014.
- PACHECO, W.A. Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra a brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo. São Paulo, SP: Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2007.
- PADILLA POESTER, F., NIELSEN, K., ERNESTO SAMARTINO, L., LING YU, W. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010.
- PAPPAS, G., PANAGOPOULOU, P., CHRISTOU, L., AKRITIDIS, N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2229–2236, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6311-4>
- PAULSEN, I.T., SESHADRI, R., NELSON, K.E., EISEN, J.A., HEIDELBERG, J.F., READ, T.D., DODSON, R.J., UMayAM, L., BRINKAC, L.M., BEANAN, M.J., DAUGHERTY, S.C., DEBOY, R.T., DURKIN, A.S., KOLONAY, J.F., MADUPU, R., NELSON, W.C., AYODEJI, B., KRAUL, M., SHETTY, J., MALEK, J., VAN AKEN, S.E., RIEDMULLER, S., TETTELIN, H., GILL, S.R., WHITE, O., SALZBERG, S.L., HOOVER, D.L., LINDLER, L.E., HALLING, S.M., BOYLE, S.M., FRASER, C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13148–13153, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.192319099>
- PEI, J., KAHL-MCDONAGH, M., FICHT, T.A. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 2014. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00023>

- PEREIRA, C.R., COTRIM DE ALMEIDA, J.V.F., CARDOSO DE OLIVEIRA, I.R., FARIA DE OLIVEIRA, L., PEREIRA, L.J., ZANGERÔNIMO, M.G., LAGE, A.P., DORNELES, E.M.S. Occupational exposure to *Brucella spp.*: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008164, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008164>
- PÉREZ FRANCO, J.J. Aislamiento de *Brucella suis* de cabras. 1972.
- PÉREZ SANCHO, M. Aplicación de nuevas estrategias en el diagnóstico y profilaxis de la brucelosis producida por “*Brucella melitensis*” en rumiantes domésticos. *Universidad Complutense de Madrid*, 2014.
- PETERSEN, E., CHAUDHURI, P., GOURLEY, C., HARMS, J., SPLITTER, G. *Brucella melitensis* cyclic di-GMP phosphodiesterase BpdA controls expression of flagellar genes. *J. Bacteriol.* 193, 5683–5691, 2011. <https://doi.org/10.1128/JB.00428-11>
- PIZARRO-CERDÁ, J., MORENO, E., GORVEL, J.P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect.* 2000. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)90368-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)90368-X)
- PLOMMET, M., FENSTERBANK, R., RENOUX, G., GESTIN, J., PHILIPPON, A., BORDE, R., MARLY, J., DUFRENOY, J., RENSEIGNÉ, N., BARRAULT, F., PLOMMET FENSTERBANK, M.R., RENOUX GESTIN A PHILIPPON R BORDE, G.J., PLOMMET G BEZARD, A.M. Brucellose bovine expérimentale. XII.-*Persistence A L'Âge adulte de L'Infection congénitale de la génisse*, 1973.
- POESTER, F.P., SAMARTINO, L.E., SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2013.
- PORTE, F., NAROENI, A., OUAHRANI-BETTACHE, S., LIAUTARD, J.P. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1481–1490, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1481-1490.2003>
- PREVENTING WITH EXPERTS DISEASES SUCH AS BRUCELLOSIS FOR A HEALTHIER WORLD, n.d. URL <https://www.preventingwithexperts.com/en/> (accessed 11.15.21).
- QUEIPO-ORTUNO, M.I., COLMENERO, J.D., BAEZA, G., MORATA, P. Comparison between Light Cycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay with Serum

- and PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Whole Blood Samples for the Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin. Infect. Dis.* 40, 260–264, 2005. <https://doi.org/10.1086/426818>
- QUEIPO-ORTUÑO, M.I., MORATA, P., OCÓN, P., MANCHADO, P., COLMENERO, J.D. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2927–30, 1997.
- RAHMAN, A.K.M.A., SMIT, S., DEVLEESSCHAUWER, B., KOSTOULAS, P., ABATI, E., SAEGERMAN, C., SHAMSUDDIN, M., BERKVEN, D., DHAND, N.K., WARD, M.P. Bayesian evaluation of three serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in bangladesh. *Epidemiol. Infect.* 147, 2019. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003503>
- RHYAN, J.C., NOL, P., QUANCE, C., GERTONSON, A., BELFRAGE, J., HARRIS, L., STRAKA, K., ROBBE-AUSTERMAN, S. Transmission of brucellosis from elk to cattle and bison, Greater Yellowstone Area, USA, 2002-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1992–1995, 2013. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130167>
- RICHARDSON, J., BARKLEY, W.E., RICHMOND, D.J., MCKINNEY, R.W. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2009.
- ROBINSON, A. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Animal Health paper 156. *Emergency Prevention System, Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2003a.
- ROBINSON, A. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. *Food Agric. Organ*, 2003b.
- ROCHA-GRACIA, R. DEL C., CASTAÑEDA-ROLDÁN, E.I., GIONO-CEREZO, S., GIRÓN, J.A. *Brucella sp.* bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 219–224, 2002. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2002.TB11309.X>
- RODRÍGUEZ, M.C., VIADAS, C., SEOANE, A., SANGARI, F.J., LÓPEZ-GOÑI, I., GARCÍA-LOBO, J.M. Evaluation of the Effects of Erythritol on Gene Expression in *Brucella abortus*. *PLoS One* 7, e50876, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050876>
- ROMERO, C., GAMAZO, C., PARDO, M., LOPEZ-GONI, I. Specific detection of *Brucella*

- DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 615–617, 1995. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.615-617.1995>
- ROSS, H.M., FOSTER, G., REID, R.J., JAHANS, K.L., MACMILLAN, A.P. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet. Rec*, 1994. <https://doi.org/10.1136/vr.134.14.359-b>
- ROSSETTI, C.A., DRAKE, K.L., SIDDAVATAM, P., LAWHON, S.D., NUNES, J.E.S., GULL, T., KHARE, S., EVERTS, R.E., LEWIN, H.A., ADAMS, L.G. Systems Biology Analysis of *Brucella* Infected Peyer's Patch Reveals Rapid Invasion with Modest Transient Perturbations of the Host Transcriptome. *PLoS One* 8, e81719, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081719>
- ROTH, F., ZINSSTAG, J., ORKHON, D., CHIMED-OCHIR, G., HUTTON, G., COSIVI, O., CARRIN, G., OTTE, J. Human health benefits from livestock vaccination for brucellosis: case study. *Bulletin of the World Health Organization*, 2003.
- ROVID SPICKLER, A. *Brucellosis in Marine Mammals*, 2007.
- SAADAT, S., MARDANEH, J., AHOORAN, M., MOHAMMADZADEH, A., ARDEBILI, A., YOUSEFI, M., MANSOURI, M. Diagnosis of cattle brucellosis by PCR and serological methods: Comparison of diagnostic tests. *Biomed. Pharmacol. J.* 10, 881–888, 2017. <https://doi.org/10.13005/bpj/1181>
- SALEEM, M.Z. Role of ticks in transmission of brucellosis and skin/hide damage in small and large ruminants. *Diss. University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore.*, 2019.
- SALVADOR-BESCÓS, M., GIL-RAMÍREZ, Y., ZÚÑIGA-RIPA, A., MARTÍNEZ-GÓMEZ, E., DE MIGUEL, M.J., MUÑOZ, P.M., CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M.S., MORIYÓN, I., IRIARTE, M., CONDE-ÁLVAREZ, R. WadD, a New *Brucella* Lipopolysaccharide Core Glycosyltransferase Identified by Genomic Search and Phenotypic Characterization. *Front. Microbiol.* 9, 2293, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02293>
- SAMARTINO, L., EDDI, C. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. *Language (Baltim)*. 27, 1–7, 2010.
- SAMARTINO, L.E., FORT, M., GREGORET, R., SCHURIG, G.G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 45, 193–199, 2000. <https://doi.org/10.1016/S0167->

- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467, 1977. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.12.5463>
- SANKARASUBRAMANIAN, J., VISHNU, U.S., DINAKARAN, V., SRIDHAR, J., GUNASEKARAN, P., RAJENDHRAN, J. Computational prediction of secretion systems and secretomes of *Brucella*: identification of novel type IV effectors and their interaction with the host. *Mol. Biosyst.* 12, 178–190, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5mb00607d>
- SAADAT, S., MARDANEH, J., AHOUREN, M., MOHAMMADZADEH, A., ARDEBILI, A., & YOUSEFI, M. Diagnosis of Cattle brucellosis by PCR and serological methods: comparison of diagnostic tests. *Biomed. Pharmacol. J.* 14.2, 881-888, 2017. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1181>
- SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E., WHATMORE, A.M., QUANCE, C.R., KOYLASS, M.S., CUMMINS, L.B., DICK JR, E.J., SNIDER, C.L., CAPPELLI, D., EBERSOLE, J.L., NATHANIELSZ, P.W., HUBBARD, G.B. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J. Med. Primatol.* 38, 70–73, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2008.00314.x>
- SCHOLZ, H.C., BANAI, M., CLOECKAERT, A., KÄMPFER, P., WHATMORE, A.M. *Brucella*, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–38, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00807.pub2>
- SCHOLZ, H.C., HOFER, E., VERGNAUD, G., FLECHE, P. LE, WHATMORE, A.M., DAHOUK, S. AL, PFEFFER, M., KRÜGER, M., CLOECKAERT, A., TOMASO, H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red Foxes, *vulpes vulpes*, in Lower Austria. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 153–155, 2009. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0036>
- SCHOLZ, H.C., HUBALEK, Z., NESVADBOVA, J., TOMASO, H., VERGNAUD, G., FLÈCHE, P. LE, WHATMORE, A.M., AL DAHOUK, S., KRÜGER, M., LODRI, C., PFEFFER, M. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg. Infect. Dis.* 2008a. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080286>

- SCHOLZ, H.C., HUBALEK, Z., SEDLÁČEK, I., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., MELZER, F., KÄMPFER, P., HEUBAUER, H., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M.S., WHATMORE, A.M., FALSEN, E., BAHN, P., GÖLLNER, C., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H.J., NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 375–382, 2008b. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0>
- SCHOLZ, H.C., NÖCKLER, K., LLNER, C.G., BAHN, P., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., KÄMPFER, P., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M.S., WHATMORE, A.M., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H.J., DE, B.K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 801–808, 2010. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>
- SCHOLZ, H.C., REVILLA-FERNÁNDEZ, S., DAHOUK, S. AL, HAMMERL, J.A., ZYGMUNT, M.S., CLOECKAERT, A., KOYLASS, M., WHATMORE, A.M., BLOM, J., VERGNAUD, G., WITTE, A., AISTLEITNER, K., HOFER, E. *Brucella vulpis* sp. Nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2090–2098, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>
- SCHURIG, G.G., ROOP, R.M., BAGCHI, T., BOYLE, S., BUHRMAN, D., SRIRANGANATHAN, N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28, 171–188, 1991. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90091-S](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90091-S)
- SELIM, A., ATTIA, K., RAMADAN, E., HAFEZ, Y.M., SALMAN, A. Seroprevalence and molecular characterization of *Brucella* species in naturally infected cattle and sheep. *Prev. Vet. Med.* 171, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104756>
- SIEIRA, R., COMERCI, D.J., SANCHEZ, D.O., UGALDE, R.A. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J. Bacteriol.* 182, 4849–4855, 2000. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4849-4855.2000>
- SILVA, T.I.B. DA, MORAES, R.S. DE, SANTOS, P. DE S., RECKZIEGEL, G.H., GOMES, Y.A., MELCHIOR, L.A.K., FERNANDES, A.C. DE C., BAPTISTA FILHO, L.C.F., SILVA, D.D. DA, REVOREDO, R.G., MELO, L.E.H. DE. Analysis of the risk factors for bovine brucellosis in dairy herds of the Rio Branco microregion, Acre, Brazil. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 86, 2019. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000792018>

- SMIRNOVA, E.A., VASIN, A. V., SANDYBAEV, N.T., KLOTCHENKO, S.A., PLOTNIKOVA, M.A., CHERVYAKOVA, O. V., SANSYZBAY, A.R., KISELEV, O.I. Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics. *Adv. Infect. Dis.* 03, 177–184, 2013. <https://doi.org/10.4236/aid.2013.33026>
- SOHN, A.H., PROBERT, W.S., GLASER, C.A., GUPTA, N., BOLLEN, A.W., WONG, J.D., GRACE, E.M., MCDONALD, W.C. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella spp.* *Emerg. Infect. Dis.* 9, 485–488, 2003. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020576>
- SOLER-LLORENS, P.F., QUANCE, C.R., LAWHON, S.D., STUBER, T.P., EDWARDS, J.F., FICHT, T.A., ROBBE-AUSTERMAN, S., O'CALLAGHAN, D., KERIEL, A.. A *Brucella spp.* isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 116, 2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00116>
- STARR, T., CHILD, R., WEHRLY, T.D., HANSEN, B., HWANG, S., LÓ PEZ-OTIN, C., VIRGIN, H.W., CELLI, J. Article Selective Subversion of Autophagy Complexes Facilitates Completion of the *Brucella* Intracellular Cycle. *Cell Host Microbe* 11, 33–45, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002>
- STOENNER, H.G., LACKMAN, D.B. A preliminary report on a *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130, 411–412, 1957.
- SVEC, D., TICHOPAD, A., NOVOSADOVA, V., PFAFFL, M.W., KUBISTA, M. ARTICLE IN PRESS G Model How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol. Detect*, 2015. Quantif. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- TANYEL, E., FISGIN, N.T., YILDIZ, L., LEBLEBICIOGLU, H., DOGANCI, L., TULEK, N. Panniculitis as the Initial Manifestation of Brucellosis: A Case Report. *Am. J. Dermatopathol.* 30, 169–171, 2008. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31816563f5>
- THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. Brucellosis in Marine Mammals. *Most* 1–11, 2018.
- THOMSEN, A. Does The Bull Spread Infectious Abort-ION in Cattle? Experimental Studies from 1936 to 1942. *J. Comp. Pathol. Ther.* 53, 199–211, 1943. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(43\)80019-9](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(43)80019-9)

- THRUSFIELD, M. Veterinary Epidemiology, Third Edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00107-7)
- TILLER, R. V., GEE, J.E., FRACE, M.A., TAYLOR, T.K., SETUBAL, J.C., HOFFMASTER, A.R., DE, B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5837–5845, 2010a. <https://doi.org/10.1128/AEM.00620-10>
- TILLER, R. V., GEE, J.E., LONSWAY, D.R., GRIBBLE, S., BELL, S.C., JENNISON, A. V., BATES, J., COULTER, C., HOFFMASTER, A.R., DE, B.K. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol.* 10, 2010b. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-23>
- TIWARI, A., PAL, V., AFLEY, P., SHARMA, D.K., BHATNAGAR, C.S., BHARDWAJ, B., RAI, G.P., KUMAR, S. Real-time PCR carried out on DNA extracted from serum or blood sample is not a good method for surveillance of bovine brucellosis. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1519–1522, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0664-8>
- TRAXLER, R.M., GUERRA, M.A., MORROW, M.G., HAUPT, T., MORRISON, J., SAAH, J.R., SMITH, C.G., WILLIAMS, C., FLEISCHAUER, A.T., LEE, P.A., STANEK, D., TREVINO-GARRISON, I., FRANKLIN, P., OAKES, P., HAND, S., SHADOMY, S. V., BLANEY, D.D., LEHMAN, M.W., BENOIT, T.J., STODDARD, R.A., TILLER, R. V., DE, B.K., BOWER, W., SMITH, T.L. Review of brucellosis cases from laboratory exposures in the United States in 2008 to 2011 and improved strategies for disease prevention. *J. Clin. Microbiol.*, 2013.. <https://doi.org/10.1128/JCM.00813-13>
- TROTTA, A., MARINARO, M., CIRILLI, M., SPOSATO, A., ADONE, R., BEVERELLI, M., BUONAVOGLIA, D., CORRENTE, M. *Brucella melitensis* B115-based ELISA to unravel false positive serologic reactions in bovine brucellosis: A field study. *BMC Vet. Res.* 16, 50, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02278-7>
- TSOLIS, R.M., SESHADRI, R., SANTOS, R.L., SANGARI, F.J., GARCÍA LOBO, J.M., DE JONG, M.F., REN, Q., MYERS, G., BRINKAC, L.M., NELSON, W.C., DEBOY, R.T., ANGIUOLI, S., KHOURI, H., DIMITROV, G., ROBINSON, J.R., MULLIGAN, S., WALKER, R.L., ELZER, P.E., HASSAN, K.A., PAULSEN, I.T. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One* 4, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005519>

- TURSE, J., PEI, J., FICHT, T. Lipopolysaccharide-Deficient *Brucella* Variants Arise Spontaneously during Infection. *Front. Microbiol.* 2, 2011. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00054>
- UHRIG, S.R., NOL, P., MCCOLLUM, M., SALMAN, M., RHYAN, J.C. Evaluation of transmission of *Brucella abortus* strain 19 in bison by intravaginal, intrauterine, and intraconjunctival inoculation. *J. Wildl. Dis.* 49, 522–526, 2013. <https://doi.org/10.7589/2012-03-071>
- VALENCIA, M., GUZMAN, M.. Brucelosis Humana. *Inst. Nac. Salud INS* 42, 1987.
- VELASCO, J., ROMERO, C., LÓPEZ-GOÑI, I., LEIVA, J., DÍAZ, R., MORIYÓN, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 759–768, 1998. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-759>
- VERGER, J.-M., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., GRAYON', M. *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1985.
- VIADAS, C., RODRÍGUEZ, M.C., SANGARI, F.J., GORVEL, J.-P., GARCÍA-LOBO, J.M., LÓPEZ-GOÑI, I. Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. *PLoS One* 5, e10216, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010216>
- VICENTE, J., VERCAUTEREN, K.C., VERCAUTEREN, K. The Role of Scavenging in Disease Dynamics. 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16501-7_7
- VILLALOBOS-VINDAS, J.M., AMUY, E., BARQUERO-CALVO, E., ROJAS, N., CHACÓN-DÍAZ, C., CHAVES-OLARTE, E., GUZMAN-VERRI, C., MORENO, E. Brucellosis caused by the wood rat pathogen *Brucella neotomae*: Two case reports. *J. Med. Case Rep.* 11, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1496-8>
- VILLALOBOS-ZÚÑIGA, M.A., BARRANTES-VALVERDE, E., MONGE-ORTEGA, P. Endocarditis por *Brucella abortus*: Reporte del primer caso en C.R *Brucella abortus* Endocarditis. *Acta Med. Costarric.* 53, 154–157, 2011.
- VITRY, M.A., MAMBRES, D.H., DEGHELT, M., HACK, K., MACHELART, A., LHOMME, F., VANDERWINDEN, J.M., VERMEERSCH, M., DE TREZ, C., PÉREZ-

- MORGA, D., LETESSON, J.J., MURAILLE, E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect. Immun.* 82, 3927–3938, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01779-14>
- VRIONI, G., PAPPAS, G., PRIAVALI, E., GARTZONIKA, C., LEVIDIOTOU, S. An Eternal Microbe: *Brucella* DNA Load Persists for Years after Clinical Cure. *Clin. Infect. Dis.* 46, e131–e136, 2008. <https://doi.org/10.1086/588482>
- WALDROP, S.G., SRIRANGANATHAN, N. Intracellular invasion and survival of *Brucella neotomae*, another possible zoonotic *Brucella* species. *PLoS One* 14, e0213601, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213601>
- WANG, Q., ZHAO, S., WURELI, H., XIE, S., CHEN, C., WEI, Q., CUI, B., TU, C., WANG, Y. *Brucella melitensis* and *B. abortus* in eggs, larvae and engorged females of *Dermacentor marginatus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1045–1048, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2018.03.021>
- WARETH, G., BÖTTCHER, D., MELZER, F., SHEHATA, A.A., ROESLER, U., NEUBAUER, H., SCHOON, H.A. Experimental infection of chicken embryos with recently described *Brucella microti*: Pathogenicity and pathological findings. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 28–34, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.06.002>
- WARETH, G., MELZER, F., TOMASO, H., ROESLER, U., NEUBAUER, H. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR. *Veterinary Research. BMC Res. Notes* 8, 2015b. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1173-1>
- WARETH, KHEIMAR, NEUBAUER, MELZER. Susceptibility of Avian Species to *Brucella* Infection: A Hypothesis-Driven Study. *Pathogens* 9, 77, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020077>
- WATTAM, A.R., FOSTER, J.T., MANE, S.P., BECKSTROM-STERNBERG, S.M., BECKSTROM-STERNBERG, J.M., DICKERMAN, A.W., KEIM, P., PEARSON, T., SHUKLA, M., WARD, D. V., WILLIAMS, K.P., SOBRAL, B.W., TSOLIS, R.M., WHATMORE, A.M., O'CALLAGHAN, D. Comparative phylogenomics and evolution of the brucellae reveal a path to virulence. *J. Bacteriol.* 196, 920–930, 2014. <https://doi.org/10.1128/JB.01091-13>
- WATTAM, A.R., WILLIAMS, K.P., SNYDER, E.E., ALMEIDA, N.F., SHUKLA, M.,

- DICKERMAN, A.W., CRASTA, O.R., KENYON, R., LU, J., SHALLOM, J.M., YOO, H., FICHT, T.A., TSOLIS, R.M., MUNK, C., TAPIA, R., HAN, C.S., DETTER, J.C., BRUCE, D., BRETTIN, T.S., SOBRAL, B.W., BOYLE, S.M., SETUBAL, J.C. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.* 191, 3569–3579, 2009. <https://doi.org/10.1128/JB.01767-08>
- WEYNANTS, V., GILSON, D., CLOECKAERT, A., TIBOR, A., DENOEL, P.A., GODFROID, F., LIMET, J.N., LETESSON, J.-J. Characterization of Smooth Lipopolysaccharides and O Polysaccharides of *Brucella* Species by Competition Binding Assays with Monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity*, 65(5), 1939-1943. 1997.
- WHATMORE, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001>
- WHATMORE, A.M., DALE, E.-J., STUBBERFIELD, E., MUCHOWSKI, J., KOYLASS, M., DAWSON, C., GOPAUL, K.K., PERRETT, L.L., JONES, M., LAWRIE, A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Reports* 2, 2015. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.000017>
- WHATMORE, A.M., DAVISON, N., CLOECKAERT, A., AL DAHOUK, S., ZYGMUNT, M.S., BREW, S.D., PERRETT, L.L., KOYLASS, M.S., VERGNAUD, G., QUANCE, C., SCHOLZ, H.C., DICK, E.J., HUBBARD, G., SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio spp.*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4120–4128, 2014. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.065482-0>
- WHATMORE, A.M., DAWSON, C.E., GROUSSAUD, P., KOYLASS, M.S., KING, A.C., SHANKSTER, S.J., SOHN, A.H., PROBERT, W.S., MCDONALD, W.L. Marine Mammal *Brucella* Genotype Associated with Zoonotic Infection - Volume 14, Number 3—March 2008 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 14, 517–518, 2008. <https://doi.org/10.3201/EID1403.070829>
- WHATMORE, A.M., PERRETT, L.L., MACMILLAN, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 7, 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-34>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Plan to Combat Neglected Tropical Diseases,

- 2008-2015. *World Health* 37, 2007. <https://doi.org/WHO/CDS/NTD/2007.3>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION AND PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 55.^o Consejo Directivo. 68.^a Sesión del Comité Regional de la OMS para las Americas, 2016..
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial manual: OIE - World Organisation for Animal Health. Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim. 2, 1185–1191, 2018.
- XAVIER, M.N., PAIXÃO, T.A., POESTER, F.P., LAGE, A.P., SANTOS, R.L. Pathological, Immunohistochemical and Bacteriological Study of Tissues and Milk of Cows and Fetuses Experimentally Infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.* 140, 149–157, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.10.004>
- YAGUPSKY, P. Blood Cultures for the Diagnosis of Human Brucellosis, in: Updates on Brucellosis. *InTech*, 2015. <https://doi.org/10.5772/61143>
- YAGUPSKY, P., BARON, E.J. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005. <https://doi.org/10.3201/eid1108.041197>
- YAGUPSKY, P., MORAT, P., COLMENERO, J.D. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 33, 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>
- YAMAMOTO, T., TSUTSUI, T., NISHIGUCHI, A., KOBAYASHI, S. Evaluation of surveillance strategies for bovine brucellosis in Japan using a simulation model. *Prev. Vet. Med.* 86, 57–74, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.03.004>
- ZHANG, T., LIANG, X., ZHU, X., SUN, H., ZHANG, S. An outbreak of brucellosis via air-born transmission in a kitchen wastes disposing company in Lianyungang, China. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.008>
- ZHELUDKOV, M.M., TSIRELSON, L.E. Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biol. Bull.* 37, 709–715, 2010. <https://doi.org/10.1134/S106235901007006X>
- ZYGMUNT, M.S., JACQUES, I., BERNARDET, N., CLOECKAERT, A. Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1370–1373, 2012. <https://doi.org/10.1128/CVI.00300-12>

ANEXOS

- A. Termo de consentimento livre e esclarecido
- B. Questionário epidemiológico
- C. Questionário individual
- D. Aprovação CEP nº 1.243/18 da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro
- E. Autorização de importação_MAPA.
- F. Autorização de exportação ICA.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Senhor (a) participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “Estudo epidemiológico de *Brucella abortus* em uma sub-região do Norte de Antioquia, Colômbia”, sob a responsabilidade da discente de doutorado Olga Lucía Herrán Ramirez, realizada sob orientação da docente Isabele da Costa Angelo e coorientação de docente Huarrisson Azevedo Santos, do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil.

Esta pesquisa tem como objetivo geral caracterizar epidemiologicamente e molecularmente os genótipos de *Brucella abortus* que circulam na população de bovinos no Norte de Antioquia e como objetivo específico identificar os fatores de risco que contribuem para a prevalência de *B. abortus* em fazendas do Norte de Antioquia. Portanto, o estudo envolve a aplicação de questionários impressos aos proprietários de fazendas de gado leiteiro do Norte de Antioquia, associados à Coopogansa del Norte.

Na sua participação você será submetido a um questionário fechado, que contém perguntas, cada uma com três opções de resposta: SIM, NÃO, NÃO SEI. As perguntas indagam informações de gestão dos animais e da fazenda. Com a realização do questionário, você estará contribuindo para aportar informação necessária para a compreensão do fenômeno da situação epidemiológica de Bruceloses bovina na região do estudo.

Os resultados da pesquisa serão publicados, mas sua identidade não será divulgada em nenhuma circunstância durante o desenvolvimento ou publicação da pesquisa. Sua participação não desenvolve risco físico ou emocional previsíveis ou passíveis de prevenção. Você é livre para retirar o consentimento para participar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo pessoal, institucional ou cooperativo. Assim também você não terá nenhum custo, bem como não terá compensação financeira pela participação.

Dúvidas em relação à pesquisa poderão ser esclarecidas pelo e-mail do pesquisador responsável: Olga Lucia Herrán Ramirez, fone. (+57)3142399453 e-mail luciaherranmvz@gmail.com.

Local, _____, Data ____ de _____ de 20__.

Eu, _____ aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Assinatura Participante da pesquisa

ANEXO B – QUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO

Nome Proprietário: _____ Telefone: _____

Nome da Fazenda: _____

Município: _____ Vereda: _____

No. De quadras no uso pecuário: _____

Bovinos Totais (#): _____ Vacas em Produção (#): _____ Vacas secas (#): _____

Certificação por ICA como Livre de Brucelose bovina. Sim___ Não___

Resultado da prova de Elisa em tanque. Positivo _____ negativo _____

	Variáveis	Categoria	Resposta		
			SI	NO	Não se
1.	Suas vacas apresentaram:	Aborto			
		Retenção placentária			
		Crianças fracas			
2.	você compra animais				
3.	Transferência de animais de outras fazendas				
4.	Realizar ou exigir um teste de brucelose negativo para animais que entram em sua fazenda:	Gado			
		Cavalos			
		Cabras e ovelhas			
		Caninos			
5.	Realize toda a criação e sua fazenda.				
6.	Suas vacas compartilham pastagem com:	Búfalos			
		Cavalos			
		Caprinos / ovelhas			
7.	Fontes de água são compartilhadas com propriedades vizinhas.				
8.	Maneja os seguintes registros reprodutivos:	Dias abertos			
		Intervalo entre nascimentos			
		# Serviços por concepção			
		Número de nascimentos			
		Dias de lactação			
		Produção de leite por vaca			
9.	Destino de placentas, fetos abortados e natimortos	São coletados e descartados como resíduos de risco biológico			
		É comido pelos urubus ou cães			
		São enterrados			
10.	Os urubus ou cães têm acesso às placentas das vacas.				
11.	Cães têm acesso a piquetes.				
12.	Usa touro				
13.	Usa inseminação artificial				
14.	Destino do leite no tratamento ou com mastite:	Fossa séptica			
		Vá para as pastagens			
		Para bezerros			

15.	Tipo de ordenha:	Piquete, ordenha manual			
		Piquete, ordenha mecânica			
		Sala, ordenha mecânica			
16.	Sua propriedade é completamente encerrada.				
17.	Entram animais estranhos a sua fazenda	Caninos			
		Gatos			
		Gado			
		Ovelhas ou cabras			
18.	Presença de animais silvestres	urubus			
		Gambás			
		Outro			
19.	Que estirpe foi utilizada na última vacinação contra a brucelose (vacinação semestral obrigatória):	Cepa 19			
		Cepa RB51			
20.	Faz adubação de prados com fezes do gado				
21.	Em qual das seguintes atividades use agulhas descartáveis e individuais e seringas por animal:	Vacinação da brucelose e aftosa			
		Tratamentos para animais			
		Desparasitação e vacinação			
22.	As principais causas pelas quais você descarta suas vacas de produção são:	Não engravide			
		Problemas na glândula mamária			
		Problemas podais			
		Abortos			
		Baixa produção de leite			
		Mastite			
23.	Tem assistência veterinária	Assistência prestada por fornecedores			
		Assistência privada			
24.	Reserve uma área exclusiva para o nascimento dos bezerros (Baia de maternidade)				

ANEXO C – Questionário individual

Identificação em fazenda	No. Amostra	Raça	Escore corporal	Idade em meses	Tempo de gestação	Antecedentes de aborto, retenções, nascimento de filhos fracos	Número de filhos	Procedência (nascido, comprado, transferido).

ANEXO D – Aprovação CEP nº 1.243/18 da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / CEP

Protocolo Nº 1.243/18

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “Estudo epidemiológico de *Brucella abortus* em uma sub-região do Norte de Antioquia, Colômbia” sob a coordenação da Professora Dr^a. Isabele da Costa Angelo, do Instituto de Veterinária/Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, processo 23083.031093/2018-84, atende os princípios éticos e está de acordo com a Resolução 466/12 que regulamenta os procedimentos de pesquisa envolvendo seres humanos.

UFRRJ, 14/01/19.

Prof.^a Dra. Lúcia Helena Cunha dos Anjos
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

ANEXO E – Autorização de importação MAPA.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SERVICO DE INSPECAO E SAUDE ANIMAL-SFA-RJ
Av Rodrigues Alves 11| ANDAR 129, - Bairro Centro, Rio de Janeiro/RJ, CEP 20081250
Telefone: 021 22339122, - <http://www.agricultura.gov.br>

Número: MP 02/2019-RJ

Rio de Janeiro, 20 de março de 2019

AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO

(para animais vivos, material de multiplicação animal, micro-organismos e produtos de origem animal e material biológico de origem animal não destinados à alimentação humana ou animal)

IMPORT PERMIT

(for living animals, animal genetic material, microorganisms and animal products or biological materials of animal origin non destined to human or animal consumption)

Licenciamento de Importação: -----

IMPORTADOR / IMPORTER/CONSIGNEE
Nome / Name: Dra. Isabele da Costa Angelo – UFRRJ
Endereço / Address: BR 465, Km 7, s/nº – Bairro Ecologia – Deptº de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ
Cidade / City: Seropédica Unidade Federativa / State: RJ
Telefone/ Phone: (21) 985111369
CARACTERIZAÇÃO DA MERCADORIA A SER IMPORTADA <i>DESCRIPTION OF THE COMMODITY TO BE IMPORTED</i>
Espécies / Species: Bovina
Mercadoria / Commodities: Amostras de DNA bovino
Finalidade / Purpose: Pesquisa científica
Quantidade / Quantity: 768 microtubos com 50 µL de DNA bovino cada, em 8 suportes
Identificação / Identification: DNA bovino purificado com o Kit Wizard Genomico DNA Purificação Promega
PROCEDÊNCIA / ORIGIN
País de origem / Country of origin: Colômbia
País exportador / Exporting country: Colômbia
País de trânsito / Country of transit: Peru
Exportador / Exporter/Consignor: Olga Lucia Herrán Ramirez / TESTLAB
Endereço / Address: Calle 74 Sur nº46e-78 – Sabaneta, Antioquia / Carrera 45D nº 60-16 Prado Centro – Medellín
DESTINO / DESTINATION:
Estabelecimento / Establishment: Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso do DESP (Lasave) – UFRRJ
Endereço / Address: BR 465, Km 7, s/nº – Bairro Ecologia – Universidade Federal Rural do Rio

ANEXO F – Autorização de exportação ICA



COMUNIDAD ANDINA

REPUBLICA DE COLOMBIA
REPUBLIC OF COLOMBIA
 MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
 MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT
INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA
AGRICULTURAL COLOMBIAN INSTITUTE
 SANIDAD ANIMAL / ANIMAL HEALTH
CERTIFICADO ZOOSANITARIO PARA EXPORTACION
CERTIFIED ZOOSANITARY FOR EXPORT

No. DE ORDEN / No. OF ORDEN:		SA-001954-19
LUGAR DE EXPEDICION/ PLACE OF EXPEDITION:	FECHA EXPEDICION/DATE EXPEDITION:	FECHA VALIDEZ/DATE OF VALIDITY:
Oficinas Nacionales - Bogota	26/03/2019	25/06/2019
EXPORTADOR/EXPORTER:	OLGA LUCIA HERRAN RAMIREZ	
DIRECCION/ADDRESS:	CL 74 SUR 46 E 78 ED MIRADOR DE LAS VEGAS	
PROCEDENCIA (Depto/Ciudad/Dirección)/ORIGIN (Department/City/Address)	CL 74 SUR 46 E 78 ED MIRADOR DE LAS VEGAS	
ESTABLECIMIENTO DE ORIGEN/ESTABLISHMENT OF ORIGIN:	OLGA LUCIA HERRAN RAMIREZ	
PUERTO DE EMBARQUE/PORT OF LOADING:	Rionegro - Aeropuerto José María Córdova	
MEDIO DE TRANSPORTE/MEAN OF TRANSPORTATION:	AÉREO	
OBJETO DE LA EXPORTACION/OBJECT OF THE EXPORT:	INVESTIGACIÓN	

CANTIDAD QUANTITY	UNIDAD UNIT	PRODUCTO PRODUCT	PRESENTACIÓN PRESENTATION	ESPECIE SPECIES	RAZA BREED	LÍNEA LINE	SEXO SEX	EDAD AGE	UNIDAD EDAD UNIT AGE
758	UNIDADES/ UNITS	ACIDO NUCLEICO EXPORTACION	UNIDAD	BIOLOGICOS					

VER REQUISITOS ANEXOS/TO SEE REQUIREMENTS

DESTINATARIO/CONSIGNEE:	Dra. Isabele da Costa Angel-UFRRJ
DIRECCION DESTINATARIO/ADDRESS CONSIGNEE:	BR 465, Km 7, s/nº – Bairro Ecologia – Deptº de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ
PAIS DE DESTINO/COUNTRY OF DESTINATION:	BRASIL
RTA DE VIAJE/TRIP ROUTE:	RIONEGRO, ANTIOQUIA - RIO DE JANEIRO, BRASIL
OBSERVACIONES/OBSERVATIONS:	

MARIA PIEDAD VARGAS TRUJILLO
 Documento No: SA-001954-19
 Id Solicitud: 02067

Elaborado por: MARIA PIEDAD VARGAS TRUJILLO