

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

**Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras
bubalinas vacinadas com a B19, pelas provas do
antígeno acidificado tamponado (corado com rosa
bengala), 2-mercaptoetanol e fixação de complemento**

GERALDO DE NARDI JÚNIOR

Botucatu - SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

**Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras
bubalinas vacinadas com a B19, pelas provas do
antígeno acidificado tamponado (corado com rosa
bengala), 2-mercaptoetanol e fixação de complemento**

GERALDO DE NARDI JÚNIOR

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, da
Universidade Estadual Paulista,
Campus de Botucatu, como requisito
para obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária, Área Saúde
Animal, Saúde Pública Veterinária e
Segurança Alimentar.

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Botucatu - SP
2009

Nome do autor: Geraldo de Nardi Júnior

Título: Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras bubalinas vacinadas com a B19, pelas provas do antígeno acidificado tamponado (corado com rosa bengala), 2-mercaptoetanol e fixação de complemento.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. André Mendes Jorge
Membro
Departamento de Produção Animal
FMVZ – UNESP – Lageado – Botucatu

Pesq. Cient. Dr^a. Lilia Paulin
Membro
Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade
Animal do Instituto Biológico de São Paulo – SP

Prof. Ass. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Membro
Departamento de Clínica Médica Veterinária
FAMEV – UFMT

Data da Defesa: 17 de dezembro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

- A Deus pelo dom da vida e por me guiar no caminho certo diante das dificuldades.
- A minha amada esposa Karina, que com paciência, sabedoria e um amor imensurável a mim dispensado, muito me ajudou no decorrer de todos esses anos, sendo o esteio da minha vida.
- A meu filho João Victor que, com sua simplicidade de criança, alegria e pureza, me deu forças nos momentos mais difíceis, mesmo sem saber.
- A minha doce e amada Mãe Terezinha, exemplo de mulher forte e guerreira, que com rédeas firmes me guiou pelos caminhos da vida e que muito me ensinou e ensina.
- Aos meus Tios João (*in memorian*) e Fausto (*in memorian*) que me ensinaram a ser um HOMEM, com dignidade, moral e fortaleza para agüentar as pancadas da vida.
- A minha madrinha Odete pelo carinho e atenção.
- Às minhas primas que como irmãs me deram muito amor e carinho e principalmente a Bete, minha irmãzinha mais velha, que nunca mediu esforços para me amparar e me dar conselhos preciosos.
- Ao meu Pai Geraldo e minha Mãe Ignês (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço

- Ao meu orientador, Márcio Garcia Ribeiro, que desde os áureos tempos de estágio e residência me orientou, muitas vezes, não só academicamente, mas também em minha vida pessoal. Exemplo de dedicação, competência e profissionalismo a ser seguido.
- Ao Prof. André Mendes Jorge pela disponibilidade aos bubalinos e várias conversas alegres e produtivas.
- Ao Prof. Antonio Carlos Paes pelos ensinamentos e “causos” contados por horas e horas.
- À Professora Jane Megid, pelo acesso ao laboratório de imunodiagnóstico.
- À Pesquisadora Lília Paulin pela ajuda e tempo a mim dispensados durante a presença em seu laboratório.
- À minha “grande” orientadora do mestrado, a qual tenho profunda estima e admiração, Margareth Genovez que desde o primeiro momento me acolheu e me orientou como a um filho.
- À todas as pesquisadoras do Instituto Biológico de São Paulo: Eliana, Maristela, Vanessa Castro, Simone Miyashiro e Rosa, pelo apoio incondicional.
- Às meninas do IB: Solange, Wanessa, Tatiana, Antera e Maria, por todas as horas alegres.

- Às meninas da República: Fabíola, Simone, Viviane e Gisele que me acolheram como a um irmão, me deram pouso, amizade e muitos momentos alegres.
- Aos funcionários da Área de Produção de Bubalinos, Liu e Lipe pela força nas colheitas de sangue e muito café.
- Ao meu amigo Caco e sua família pelas horas alegres e longas conversas encima de nossos cavalos.
- Às residentes da MI: Marília, Eliana, Ariane, Verônica e Jaqueline, que com muita competência e carinho dão o sangue aos animais atendidos, se pudesse estaria aí de novo.
- Aos funcionários: Seu Roberto, Pardal, Dona Ana e Adriana pelo companheirismo e risadas.
- Ao setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais, setor que tanto amo e que me ensinou a ser um Médico Veterinário desde 1998.
- Aos meus bichos: dois cavalos (Negão e Luna), quatro cães (Pintado, Caquinho, Toby e Vida), um gato (Cindy), um jaboti (Felipa), uma porquinha da índia (Pipoca), três galinhas (Jacó, Pintada e Baia) e onze pássaros, que por muitas vezes, tiveram mais paciência comigo, do que eu com eles.
- A todos que direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho e não por desleixo, mas por lapso de memória não citei.
- A CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	= porcentagem
+/-	= mais ou menos
µL	= microlitro
2-ME	= 2-mercaptoetanol
AAT	= antígeno acidificado tamponado
cm	= centímetro
CO ₂	= gás carbônico
DNA	= ácido desoxirribonucléico
et al.	= e colaboradores
EUA	= Estados Unidos da América
FAO	= Food and Agriculture Organization
FC	= fixação de complemento
FMVZ	= Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
H ₂ S	= ácido sulfídrico
Ig	= imunoglobulina
IgG	= imunoglobulina G
IgM	= imunoglobulina M
M	= molar
MAPA	= Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL	= mililitro
mm	= milímetro
n ^o	= número
°C	= graus Celsius
pH	= potencial hidrogeniônico

PNCEBT = Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose

SAL = soroaglutinação lenta em tubos

SAR = soroaglutinação rápida em placa

sp = espécie

TECPAR = Instituto de Tecnologia do Paraná

UI = Unidades Internacionais

UNESP = Universidade Estadual Paulista

USDA = United States Department of Agriculture

WHO = World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova do antígeno acidificado tamponado corado (AAT), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 43
- Figura 2 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, no teste de soroaglutinação lenta (SAL), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 45
- Figura 3 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, no teste de 2-mercaptoetanol (2-ME), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 47
- Figura 4 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 49
- Figura 5 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova de fixação de complemento (FC), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 51
- Figura 6 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, nas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME) e fixação de complemento (FC), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 52

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Bezerras bubalinas reagentes na prova do antígeno acidificado (AAT) vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 42
- Quadro 2 - Títulos de anticorpos detectados pelo teste de soroaglutinação lenta (SAL) em bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 44
- Quadro 3 - Títulos de anticorpos detectados pelo teste de 2-mercaptoetanol (2-ME) em bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 46
- Quadro 4 - Bezerras bubalinas reagentes na prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME) vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 48
- Quadro 5 - Bezerras bubalinas reagentes na prova de fixação de complemento (FC) vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009..... 50

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Generalidades sobre a criação de bubalinos.....	15
2.2. Impacto econômico da brucelose em bubalinos.....	17
2.3. Implicações em saúde pública.....	18
2.4. Brucelose em bubalinos.....	19
2.4.1. Propriedades gerais do gênero <i>Brucella</i>	19
2.4.2. Epidemiologia.....	21
2.4.3. Patogenia.....	22
2.4.4. Manifestações Clínicas.....	25
2.4.5. Controle.....	25
2.4.6. Diagnóstico.....	26
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Animais.....	33
4.2. Vacinação.....	33
4.3. Colheita das amostras de sangue.....	34
4.4. Provas sorológicas.....	35
4.4.1. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT).....	35
4.4.2. Prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME).....	36
4.4.2.1. Teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL).....	36
4.4.2.2. Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME).....	37
4.4.3. Prova de fixação de complemento (FC).....	38
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	70
TRABALHO CIENTÍFICO.....	01

NARDI JUNIOR, G. **Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras bubalinas vacinadas com a B19, pelas provas do antígeno acidificado tamponado (corado com rosa bengala), 2-mercaptoetanol e fixação de complemento.** Botucatu, 2009. 70p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O perfil sorológico de 21 fêmeas bubalinas vacinadas entre três a oito meses de idade, com amostra-padrão da vacina B19 (*Brucella abortus*), foi avaliado pelas provas do antígeno acidificado tamponado corado com rosa bengala (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e fixação de complemento (FC). As colheitas foram realizadas no dia zero (vacinação), 15, 30, 45,60 e, subsequentemente, a cada 30 dias até o 720^o dia pós-vacinal. Nenhum animal foi reagente no dia zero. No 15^o dia pós-vacinal, acima de 95% dos animais reagiram em todas as provas. Os títulos máximos na soroaglutinação lenta em tubos e 2-mercaptoetanol foram obtidos entre 15^o e 45^o dia após a vacinação. Entre 120 e 150 dias foi observado o declínio das reações nos animais em todas as provas. Na FC, AAT e 2-ME todos os animais resultaram não reagentes, respectivamente, aos 270, 300 e 360 dias da vacinação. Nenhum dos animais apresentou oscilação de títulos ou reações nas três provas após 360 dias de acompanhamento.

Palavras-chave: brucelose, bubalinos, vacinação, B19, perfil sorológico

NARDI JUNIOR, G. **Serological profile of buffaloes female calves against *Brucella abortus*, vaccinated with B19, by rose bengal plate, 2-mercaptoethanol and complement fixation tests.** Botucatu, 2009. 70p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The serological profiles of 21 female buffaloes, vaccinated at three to eight months of age using the B19 standard strain of *Brucella abortus* were evaluated by rose bengal plate, 2-mercaptoethanol and complement fixation tests. The serum samples were collected in day zero (vaccination), 15, 30, 45, 60th and, subsequently to each 30 months, until 720th day after vaccination. No animal showed reaction in day zero. In 15th day, more than 95% of animals showed reaction in all tests. The maximum levels of antibodies detected by the tube agglutination and 2-mercaptoethanol tests were found between the 15 and 45th days after vaccination. Between 120 and 150 days after vaccination was observed decreased of reactions in all the tests. All the animals showed absence of reactions in complement fixation, rose bengal plate and 2-mercaptoethanol tests at 270, 300 and 360 days respectively after vaccination. None of animals presented oscillation of titers on reactions in any test after 360 day of study.

Keywords: brucellosis, buffaloes, vaccination, B19, serological profile

1. INTRODUÇÃO

A brucelose em bubalinos e bovinos é reconhecida como doença infecto-contagiosa causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*), caracterizada por manifestações clínicas da esfera reprodutiva e severos prejuízos aos produtores (ACHA e SZYFRES, 2003).

O sistema de manejo extensivo, as dificuldades do sucesso de programas de controle sanitário em países com grandes rebanhos e com extensa dimensão territorial, e o conceito equivocado de que os bubalinos são altamente resistentes às doenças que acometem os bovinos, são fatores que dificultam o controle da brucelose em bubalinos (GUARINO et al., 2001). Fosgate et al. (2002) apontaram evidências de características distintas na cadeia epidemiológica da brucelose em bovinos e bubalinos, que reforçam a necessidade de investigações específicas com a doença em bubalinos, visto que a maioria dos estudos enfoca a doença na espécie bovina.

A espécie bubalina apresenta como características peculiares a sua grande rusticidade e adaptabilidade a fatores climáticos, topográficos e solos pobres, somadas à dupla aptidão para produção de carne e leite, o que a torna boa alternativa para a produção de proteína animal, principalmente em países tropicais como o Brasil (MARQUES e CARDOSO, 1997; NARDI JÚNIOR, 2005). O estreito contato com a espécie bovina, o padrão extensivo de criação dos bubalinos, o acesso contínuo desses animais a diversos tipos de ecossistemas, o hábito da espécie bubalina em banhar-se visando a termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e tanques tornam esta espécie francamente exposta às infecções, incluindo a brucelose (MARQUES e CARDOSO, 1997; NARDI JÚNIOR et al., 2007).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT (BRASIL, 2009), deflagrado em 2001, preconiza que o sorodiagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas seja realizado a partir dos 24 meses de idade, nas bezerras vacinadas com a B19 entre 3 a 8 meses de idade, utilizando as provas do antígeno acidificado tamponado (corado com rosa bengala) [AAT], 2-mercaptoetanol (2-ME) e/ou fixação de complemento (FC). Tal recomendação faz-se necessária no intuito de evitar dificuldades na interpretação das provas sorológicas, decorrentes da presença de

imunoglobulinas (Ig) residuais de origem vacinal, que poderiam dificultar a diferenciação entre animais infectados e doentes.

As investigações sorológicas voltadas à brucelose bubalina no Brasil praticamente estão restritas à comparação de animais reagentes frente às diferentes técnicas diagnósticas. Com efeito, são escassos os estudos no país conduzidos no acompanhamento sorológico de bezerras bubalinas vacinadas, conforme as recomendações do PNCEBT, particularmente no que tange ao uso das provas confirmatórias do 2-mercaptoetanol e fixação de complemento.

O presente estudo avaliou o perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras bubalinas, vacinadas entre 3 a 8 meses com a B19, utilizando os métodos sorológicos recomendados pelo PNCEBT, com vistas a contribuir para o diagnóstico e controle da brucelose em bubalinos no Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Generalidades sobre a criação de bubalinos

A população mundial de bubalinos é da ordem de 170 milhões de cabeças. O rebanho bubalino da América do Sul é estimado em cerca de 4 milhões de cabeças, das quais 3,5 milhões encontram-se no Brasil, 150 mil na Venezuela, 50 mil na Argentina, 30 mil na Colômbia e o restante distribuído pelos demais países (FAO, 2003; PAULIN, 2006).

Os bubalinos são pouco seletivos em relação às forrageiras e transformam alimentos, usualmente não consumidos por outros animais do mesmo porte, em proteínas nobres (MARQUES e CARDOSO, 1997). Apresentam resultados satisfatórios quanto ao rendimento de cortes primários da carcaça e podem até mesmo superar os bovinos em determinados cortes, o que contribui muito para desmistificar a espécie e esclarecer a cadeia produtiva quanto ao seu real potencial de produção (JORGE, 1999; JORGE, 2001).

O leite bubalino apresenta menor teor de colesterol, maior teor de gordura e de proteínas quando comparado ao leite bovino, além de maior rendimento na produção de queijo (particularmente a *mozzarella*) e manteiga (JORGE et al., 2002; ANDRIGUETO, 2004). A produção de leite dos bubalinos é uma atividade que tem crescido nos últimos anos no Brasil, particularmente nos estados da região Sudeste, nos quais o leite é destinado, quase na sua totalidade, à produção de queijo *mozzarella*, que possui mercado assegurado e preços compensatórios, em virtude da qualidade nutricional e palatabilidade do produto (MADELLA-OLIVEIRA et al., 2005).

No Brasil, os búfalos foram introduzidos em 1895 pela ilha de Marajó, importados da Austrália, Egito, Índia, Itália e países do sudoeste asiático. Na ilha de Marajó, os bubalinos encontraram condições ótimas para sua adaptação. Nas décadas seguintes foram introduzidos nas demais regiões do país, particularmente que apresentam clima quente e úmido (MARQUES e CARDOSO, 1997).

O rebanho bubalino brasileiro concentra-se, atualmente, na região norte do país (65,9%) e o restante localiza-se nas regiões Nordeste (7,1%), Sudeste (7,5%), Sul (13,3%) e Centro-Oeste (6,2%), distribuído entre as raças Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (MARQUES e CARDOSO, 1997; JORGE,

2005). Apesar da escassez de estatísticas oficiais, a criação de bubalinos no mundo todo e, em particular no Brasil, tem apresentado crescimento substancial, rompendo fronteiras, produzindo e se adaptando aos locais nos quais outras espécies de ruminantes não tem apresentado índices zootécnicos satisfatórios (JORGE, 2005).

Baruselli (1993) referiu que os bubalinos podem ser criados no Brasil em regiões topográficas impróprias para bovinos, tais como várzeas inundáveis do rio Amazonas, baixadas litorâneas como o Vale do Ribeira, SP, Pantanal do Mato-Grosso e banhados da região Sul.

As características peculiares da criação de bubalinos tem despertado o interesse dos pecuaristas no Brasil, fazendo com que, na última década, a bubalinocultura aumentasse 12,7% ao ano, ganhando crescente importância econômica na pecuária nacional, tanto na produção de carne quanto de leite, colocando o Brasil no cenário dos maiores rebanhos comerciais do mundo (MARQUES e CARDOSO, 1997).

2.2. Impacto econômico da brucelose em bubalinos

A brucelose em animais de produção possui distribuição mundial e determina severos prejuízos de ordem econômica (FERRAZ, 1999).

Na América Latina, as perdas econômicas devido a brucelose são da ordem de 600 milhões de dólares/ano. No Brasil, estima-se que os prejuízos com a brucelose em bovinos e bubalinos sejam ao redor de 100 milhões dólares/ano (FOLHA DE SÃO PAULO, 2000).

Os prejuízos para a bubalinocultura com a brucelose são determinados principalmente por problemas da esfera reprodutiva (TIMONEY et al., 1988). Marques e Cardoso (1997) referiram que a doença é a principal causa de abortamentos em rebanhos bubalinos na Índia, na Itália e no Brasil.

As fêmeas das espécies bubalina e bovina provenientes de rebanhos livres de brucelose apresentam altas taxas de abortamentos (5-30%) na primoinfecção, e nascimentos de bezerros fracos ou doentes (15%). Com a cronicidade da doença, as vacas apresentam redução na produção de leite (10 a 25%), diminuição na vida útil, aumento nas taxas de reposição (30%) e no número de repetições de cio. Destaca-se também, que uma em cada cinco

vacas acometidas desenvolve sub ou infertilidade, aumento no intervalo entre partos (8,5 meses) e redução no número de concepções. Em suma, a doença determina alterações em todos os parâmetros reprodutivos do plantel. Ademais, os países nos quais a doença cursa de forma endêmica possuem sérias restrições à exportação de animais, produtos e derivados (FARIA, 1984; JOINT, 1986; CAMPOS et al., 1993; LÁU, 1999; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

2.3. Implicações em saúde pública

A brucelose é considerada doença ocupacional em humanos. O advento da pasteurização do leite representou redução significativa no impacto da doença em saúde pública. Porém, nos países emergentes (em desenvolvimento), a brucelose permanece como doença preocupante (ACHA e SZYFRES, 2003).

As infecções pelo gênero *Brucella* em humanos possuem forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com certo risco de exposição aos animais, tais como médicos veterinários, magarefes, produtores e laboratoristas (USDA, 2009). A *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) é reconhecida como a espécie mais patogênica para humanos, seguida por *Brucella suis* (*B. suis*), *Brucella abortus* e *Brucella canis* (*B. canis*). No entanto, a maioria das infecções em humanos é causada por *B. abortus*, visto que esta é a brucela mais difundida em animais de produção (ACHA e SZYFRES, 2003).

A doença em humanos por *B. abortus* se manifesta geralmente por sinais de febre intermitente, cefaléia, dor muscular e nas articulações. Em geral, as manifestações clínicas por *B. abortus* são mais brandas que as observadas nas infecções por *B. melitensis* ou *B. suis* (ACHA e SZYFRES, 2003; PAULIN, 2006).

No Brasil, há poucas descrições de isolamento do microrganismo em humanos, embora os registros disponíveis em investigações sorológicas sugere altos níveis de exposição para os grupos de risco ou de vulnerabilidade, relacionados à ocupação profissional (HOMEM et al., 2000).

Nos humanos, a infecção pelo gênero *Brucella* pode ser provocada pelo contato direto com secreções de animais domésticos, fetos, placentas,

secundinas, sangue e carcaças de animais infectados, bem como pelo consumo de produtos e subprodutos de origem animal (RADOSTITS et al., 2007).

O alto risco de infecção em humanos a partir dos bovinos e bubalinos tem sido frequentemente referido na literatura especializada, principalmente em indivíduos que possuem contato estreito com animais (TAYLOR e PERDUE, 1989; ACHA e SZYFRES, 2003). Lacerda et al. (1997) encontraram 11,8% de indivíduos sororreagentes em 59 trabalhadores de abatedouro, reforçando o comportamento ocupacional da doença.

O leite ingerido “in natura” ou sob a forma de derivados, sem pasteurização prévia, pode veicular o microrganismo para os humanos (USDA, 2009). Botelho et al. (1990) assinalaram alta ocorrência da infecção em humanos pela ingestão de leite e subprodutos “in natura” de vacas. Miyashiro (2004) utilizando técnicas moleculares detectou a presença de DNA do gênero *Brucella* em derivados de leite bovino comercializados de forma clandestina. Neste estudo o microrganismo foi identificado em 29 dentre 141 (20,56%) queijos tipo minas frescal e 8 dentre 51 (15,68%) queijos minas meia cura.

As características físico-químicas peculiares do leite da espécie bubalina, que incluem maiores teores de proteína, gordura e caseína, propiciam a produção de derivados nobres como os queijos *mozzarella*, provolone e ricota (JORGE et al., 2002; ANDRIGUETO, 2004). No entanto estes derivados podem ser elaborados sem prévia pasteurização ou outro tratamento térmico do leite, representando risco de contágio pelos humanos mediante o consumo destes derivados (USDA, 2009).

2.4. Brucelose em bubalinos

2.4.1. Propriedades gerais do gênero *Brucella*

A brucelose é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, que se apresentam microbiologicamente como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, desprovidos de cápsulas e não formadores de esporos (NIELSEN et al., 2004). Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificados como

microrganismos catalase e oxidase positivos, não fermentadores da lactose (PAULIN, 2003), urease positivos (reação em poucos minutos) e indol negativos (QUINN et al., 2005).

Microrganismos do gênero *Brucella* são intracelulares. A patogenia e a natureza da resposta imune estão intimamente relacionadas à presença da bactéria no interior de fagócitos (GONZALEZ et al., 2006).

B. abortus é isolada entre 3 a 5 dias no ágar-*Brucella* ou no meio convencional de ágar enriquecido com sangue ovino ou bovino a 5% (desfibrinado), em condições de microaerofilia, a 37°C. A partir de três dias de incubação, as colônias apresentam 2 a 3 mm de diâmetro, são opacas, lisas e não hemolíticas (NIELSEN e DUNCAN, 1990). No cultivo microbiano de materiais suspeitos sujeitos à contaminação bacteriana secundária, são recomendados meios seletivos como o Farrel, constituído de vários antimicrobianos e antifúngicos impeditores para outros microrganismos (NIELSEN e DUNCAN, 1990).

As brucelas são divididas em dois grandes grupos antigenicamente distintas, denominadas lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e rugosas (*B. ovis* e *B. suis*) [METCALF et al., 1994], diferenciadas com base nas características de primo-isolamento em meios de cultura e na estrutura da parede bacteriana (NIELSEN et al., 2001).

As brucelas não apresentam espécie-especificidade. No entanto, mostram certa predileção por determinados hospedeiros. Dentre as brucelas lisas, *B. abortus* acomete preferencialmente bovídeos, enquanto *B. suis* e *B. melitensis* infectam, respectivamente, suínos e caprinos. Nas brucelas rugosas, *B. canis* é o principal agente causal da brucelose em canídeos e *B. ovis* em ovinos (NIELSEN et al., 2001).

O gênero *Brucella* possui vários biotipos ou biovars. A diferenciação dos biotipos é fundamentada no requerimento de CO₂, na produção de H₂S, na multiplicação na presença de tionina e fucsina básica, na aglutinação com anti-soros monoespecíficos (A, M, R) e na lise por bacteriófagos (NIELSEN e DUNCAN, 1990; QUINN et al., 2005). Considera-se que *B. abortus* possua sete biotipos, embora maior número tenham sido descritos até o momento, mas não reconhecidos na rotina de caracterização atual da espécie. Assume-se, também, que *B. suis* possua cinco biotipos e *B. melitensis* três, enquanto *B.*

ovis, *B. canis* e *B. neotomae* não apresentariam biovariantes (QUINN et al., 2005). Nielsen e Duncan (1990) postularam que todas as espécies do gênero *Brucella* reconhecidas atualmente teriam derivado de *B. abortus* biotipo 2.

As biovariantes apresentam certas diferenças quanto à predileção pela infecção em determinadas espécies animais (NIELSEN, 1990).

Em todo o mundo, a brucelose em bubalinos e bovinos é causada predominantemente pelo biotipo 1 (BISHOP et al., 1994). Estudo realizado em 37 países visando o isolamento de *B. abortus* das principais espécies domésticas constatou que, dentre 266 linhagens isoladas, 241 (90,6%) foram de vacas pertencentes predominantemente aos biotipos 1, 2 e 3, reforçando a espécie bovina como o principal reservatório de *B. abortus* (NIELSEN e DUNCAN, 1990).

No Brasil, até 1985, foram descritos os biotipos 1, 2 e 3 de *B. abortus*, e o biotipo 1 em isolados de *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis* (GARCÍA-CARRILLO, 1990).

Megid et al. (2005) investigaram no país a caracterização de biotipos em quatro fetos bovinos e um bubalino. Foram identificados o biotipo 1 (um feto bovino e um feto bubalino), biotipo 2 (um feto bovino) e biotipo 3 (dois fetos bovinos), representando o primeiro registro nacional da caracterização de biotipo em linhagem de *B. abortus* isolada de feto bubalino, além de ressaltar o predomínio dos biotipos 1, 2 e 3 nos abortamentos nestas espécies animais.

2.4.2. Epidemiologia

A bactéria é transmitida principalmente por alimentos contaminados, água, leite ou pelo contato direto com animais infectados, que a eliminam por todas as vias, sobretudo pelo feto, descargas uterinas e leite (ACHA e SZYFRES, 2003). É encontrada em concentrações elevadas no material abortado e na placenta. Os bubalinos e bovinos geralmente contraem a doença ingerindo alimentos e água contaminados por fetos abortados (VASCONCELLOS et al., 1987).

A brucelose possui distribuição mundial (FERRAZ, 1999; RADOSTITS et al., 2007), exceto nos países que a erradicaram utilizando ações sistemáticas

de controle, como países da Europa, EUA, Japão e França (MOLNÁR et al., 1997).

A brucelose tem sido descrita em bubalinos, bovinos, suínos, pequenos ruminantes, eqüinos e cães (GARCIA-CARRILO, 1990), assim como em roedores, lobos, cervídeos, gambás e outras espécies selvagens, embora não haja evidências de que estas espécies contribuam significativamente na ocorrência da doença nos rebanhos de animais de produção (RADOSTITS et al., 2007).

Os microrganismos do gênero *Brucella* resistem às condições adversas do ambiente (GONZALEZ et al., 2006), incluindo extremos de pH, temperatura e luz solar direta (NIELSEN, 1995). Podem resistir por seis meses ou mais na água, nos fetos abortados, em restos de placenta, nas fezes, na lã, no feno ou no solo (BRASIL, 2006; LUCERO et al., 2008). No leite e derivados, mantêm-se viáveis por vários meses (OMER et al., 2000). A fervura e temperaturas usuais de pasteurização destroem o microrganismo (PAULIN, 2003). Desinfetantes clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeído (2%) e compostos fenólicos (2,5%) inativam o microrganismo a partir de 15 minutos de exposição (CASTRO et al., 2005). O álcool (70%) destrói prontamente a bactéria (PAULIN, 2003). Já sob ação do carbonato de cálcio (1:10), o microrganismo é inativado após 30 minutos de exposição (OMER et al., 2000).

2.4.3. Patogenia

O ingresso da *Brucella* sp em rebanhos livres determina, inicialmente, elevado número de abortamentos (ACHA e SZYFRES, 2003). Nas gestações subseqüentes ainda ocorre invasão do útero, mas a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente os abortamentos reincidem na terceira prenhez. Após a fase aguda sobrevém à crônica, quando abortam somente os animais recém introduzidos no rebanho ou novilhas de primeira cria (BISHOP et al., 1994; RADOSTITS et al., 2007).

Dentre os ruminantes domésticos, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, embora também possa ocorrer pelo contato direto com animais infectados ou pelo sêmen (ACHA e SZYFRES, 2003; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). A transmissão vertical pode

desencadear o estado de “portador latente”, fenômeno relatado entre 1 a 9% das novilhas nascidas de fêmeas infectadas. Estes animais apresentam-se sorologicamente negativos ou com títulos oscilantes (NIELSEN e DUNCAN, 1990). As fêmeas latentes geram grandes dificuldades nas ações de controle da doença (BISHOP et al., 1994).

As brucelas penetram no organismo dos mamíferos pelas mucosas do trato digestório, genital, nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Em bubalinos e bovinos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. A partir do trato digestório a bactéria é carregada aos linfonodos mesentéricos e fagocitada principalmente por macrófagos. Nos fagócitos podem permanecer quiescentes por vários meses. A bacteremia ocorre por cerca de duas semanas nos bovinos e bubalinos, com o microrganismo livre no plasma ou no interior dos macrófagos (NIELSEN e DUNCAN, 1990).

O microrganismo possui tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, como baço, fígado e linfonodos (BATHKE, 1988; ACHA e SZYFRES, 2003). A multiplicação da bactéria é estimulada pelo produto da degradação do eritritol, reconhecido como um açúcar presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores femininos e masculinos. O eritritol atinge grandes concentrações no útero gravídico, principalmente nos líquidos fetais, nos placentomas e no tecido córion-alantoideano (PAULIN e FERREIRA NETO, 2008). A presença do eritritol no útero gravídico justificaria, em parte, a brucelose como doença da esfera reprodutiva em certas espécies, incluindo os bubalinos (KINDAHL, 2004).

A produção do eritritol cresce na razão direta da evolução da gestação, porém apresenta alta concentração até os cinco meses da prenhez (SAMARTINO et al., 1996). Tal fato sugere que outras substâncias possam estimular a multiplicação das brucelas, potencializando a ação do microrganismo na placenta e/ou feto (KINDAHL, 2004).

A multiplicação de *B. abortus* nos placentomas determina necrose, lise das vilosidades e subsequente descolamento do cotilédone e da carúncula. Somente a lesão placentária é suficiente para desencadear o sofrimento fetal por má absorção e oxigenação, culminando com o abortamento. No entanto, o microrganismo frequentemente invade o feto, determinando infecções em

órgãos como pulmão, fígado e baço. Paralelamente, certas fêmeas podem levar a gestação a termo, gerando o nascimento de bezerros doentes e debilitados, que podem vir a óbito em poucos dias. O processo cicatricial e o depósito de fibrina nos placentomas resultam em aderências da placenta nas gestações subseqüentes, que determinam altas taxas de retenção de placenta em rebanhos nos quais a doença cursa de forma crônica (ACHA e SZYFRES, 2003). Ademais, as bubalinas acometidas podem apresentar quadros de metrite, sub-fertilidade e/ou infertilidade (BATHKE, 1988; ACHA e SZYFRES, 2003).

Após o abortamento a bactéria migra para outros órgãos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, podendo determinar mastite crônica ou manter-se quiescente nos linfonodos até a gestação subseqüente (GRASSO-PAULIN, 2000). Os animais infectados eliminam a bactéria em grandes quantidades pelos produtos do abortamento, no parto ou pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos suscetíveis. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e pode persistir por vários meses (ACHA e SZYFRES, 2003).

Nos touros, a brucela se instala principalmente nos órgãos acessórios do sistema reprodutivo, particularmente na vesícula seminal, podendo ser eliminada pelo sêmen. No entanto, a transmissão do microrganismo pela monta natural é epidemiologicamente menos freqüente se comparada a via oral (SHUTHERLAND, 1980).

2.4.4. Manifestações Clínicas

Na espécie bubalina, as manifestações clínicas da brucelose estão relacionadas principalmente à esfera reprodutiva, causadas predominantemente pela infecção por *B. abortus*. Esta espécie de brucela determina placentite necrótica, morte fetal e abortamentos geralmente no terço final do período gestacional. A gestação poderá também vir a termo, gerando produtos fracos, que poderão morrer nas primeiras semanas (GRASSO e CARDOSO, 1998). Metrites, retenções placentárias e higroma articular ocorrem como seqüela da infecção por *B. abortus* (VASCONCELLOS et al., 1987; LÁU, 1999).

Nos touros, a patogenicidade da bactéria está relacionada à lesão testicular e das glândulas acessórias, manifestadas por quadros de orquite, epididimite e vesiculite (RADOSTITS et al., 2007), levando comumente os animais infectados à subfertilidade e/ou infertilidade, somados aos baixos indicadores reprodutivos do rebanho (NICOLETTI, 1986).

2.4.5. Controle

A capacidade de sobrevivência das brucelas em condições naturais é elevada se comparada à outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambientes úmidos, ao abrigo da luz solar direta, pH próximo ao neutro e na presença de matéria orgânica. A bactéria pode permanecer viável por até seis meses em pastos nos quais ocorreram casos de abortamento (USDA, 2009). Em geral, a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento e a adoção do vazio das instalações (no mínimo seis meses), são recomendados para evitar a transmissão para animais suscetíveis nas propriedades que a doença cursa de forma endêmica (BRASIL, 2009; USDA, 2009).

Embora os mecanismos de transmissão da brucelose bovina e bubalina sejam semelhantes, certas particularidades do comportamento da criação de bubalinos devem ser consideradas previamente ao estabelecimento de programas de controle. A criação bubalina é quase que exclusivamente extensiva, com a utilização de grandes áreas, proporcionando acesso contínuo a diversos tipos de ecossistemas. Ademais, são animais fortes, possuem hábitos migratórios e gregários. Movimentam-se principalmente à noite pelos pastos, rios e aguadas. Na procura de alimento ou água, podem invadir outros pastos e entrar em contato com outros grupos de animais, aumentando a possibilidade de difusão da doença. O hábito dos bubalinos de banharem-se visando à termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e açudes, contribuem para a exposição da espécie a determinados microrganismos, entre os quais as brucelas, visto que esses ambientes permitem a sobrevivência da bactéria (MARQUES e CARDOSO, 1997; GUARINO et al., 2001; FOSGATE et al., 2002).

Em todo o mundo, os países que alcançaram “status” de controle ou erradicação da brucelose, fundamentaram seus programas na adoção de medidas semelhantes às preconizadas pelo Brasil no PNCEBT, particularmente pela vacinação sistemática das bezerras, adoção de quarentena e medidas higiênicas sanitárias nos rebanhos, realização de diagnóstico sorológico continuado nos plantéis, aliado ao abate sanitário dos animais reagentes (GRASSO e CARDOSO, 1998; BRASIL, 2009).

2.4.6. Diagnóstico

O isolamento de *B. abortus* dos fetos abortados, da placenta e do leite é considerado o método mais fidedigno no diagnóstico individual da brucelose (SANDOVAL et al., 1979). No entanto, a dificuldade de isolamento do microrganismo e a restrição no diagnóstico dos rebanhos dificultam o uso do diagnóstico microbiológico como método de controle massal da doença (VASCONCELLOS et al., 1987). Neste contexto, devido às limitações dos procedimentos laboratoriais que se apóiam no cultivo do gênero *Brucella*, o diagnóstico da brucelose bubalina tem sido fundamentado na investigação de Ig anti-*B. abortus* no soro sanguíneo e no leite (CASAS-OLASCOAGA, 1976; NIELSEN e DUNCAN, 1990).

A persistência de Ig séricas pós-vacinais e a ocorrência de reações inespecíficas nos métodos sorológicos convencionais têm-se constituído no principal entrave no sorodiagnóstico da doença em bubalinos. Dentre estas reações inespecíficas incluem-se as reações cruzadas entre as linhagens lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) ou com outros microrganismos Gram-negativos, quais sejam dos gêneros *Pasteurella*, *Francisella*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Yersinia* (0:9) [LÁZARO e HOFER, 1996; MOLNÁR et al., 1997].

Tanto nos humanos como nos animais, a infecção natural por *Brucella* sp estimula o aparecimento quase simultâneo de Ig das classes IgM e IgG. Durante a evolução da doença ocorre declínio e tendência do desaparecimento dos níveis de IgM, enquanto IgG persiste em níveis elevados. O desaparecimento de IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção (OLASCOAGA, 1976).

Em contraste, bubalinos e bovinos vacinados com a cepa padrão B19 apresentam predomínio da classe IgM, que mostram concentrações máximas por volta do 13^o dia após a vacinação, enquanto a classe IgG - particularmente a subclasse IgG1 - é observada em pequenas quantidades, com picos máximos entre o 28^o e o 42^o dia pós-vacinais (SHUTHERLAND, 1980). Ribeiro et al. (1997), no Brasil, acompanharam o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bovinas entre três a oito meses, vacinadas com a dose padrão da B19, e observaram títulos sorológicos máximos na prova de soroaglutinação rápida em placa (SAR) - que detecta ambas IgM e IgG - , entre o 14^o e o 42^o dias pós-vacinais e, no 2-ME - que prioriza reações com IgG - , entre o 28^o e 42^o dia, com ausência de animais reagentes aos 308 dias após a vacinação.

O diagnóstico sorológico da brucelose em bubalinos e bovinos no Brasil foi modificado pela Instrução normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2009). O PNCEBT preconiza as provas do AAT, 2-ME e FC para o diagnóstico sorológico da brucelose bubalina e bovina. O AAT é recomendado como método de rotina (triagem), enquanto o 2-ME e FC como provas confirmatórias, embora somente a FC seja preconizada para o trânsito e comércio internacional de animais (BRASIL, 2009).

Após a deflagração do PNCEBT no Brasil, em 2001, a prova do AAT tem sido utilizada como método de rotina, em substituição a prova clássica de soroaglutinação rápida em placa, em virtude da boa sensibilidade e especificidade do AAT, apesar da detecção preferencialmente da classe IgG nesta prova, fato que limita a identificação de animais no início de infecção (BRASIL, 2009).

Na prova do AAT, a presença de qualquer reação de aglutinação classifica o animal como reagente. A critério do médico veterinário, os animais reagentes no AAT poderão ser submetidos às provas confirmatórias do 2-ME ou FC. A prova do AAT é constituída do antígeno a 8%, realizada em placa de vidro, com leitura em quatro minutos de reação. A acidificação do antígeno a pH 3,65 limita a aglutinação da classe IgM, ao contrário da IgG que mantém a capacidade aglutinante neste pH ácido (SHUTHERLAND, 1980; WRIGHT e NIELSEN,1990).

A prova de 2-ME possui boa sensibilidade e alta especificidade, e se caracteriza pela detecção de IgG, considerada a principal classe de Ig presente em animais infectados por *B. abortus*. A reação de 2-ME é realizada em tubos mantidos em estufa, com antígeno em concentração de 0,045% e leitura com 48 horas. O composto 2-ME rompe as pontes dissulfídicas (enxofre) dos pentâmeros de IgM, resultando em monômeros de IgM que perdem a capacidade aglutinante, priorizando assim as reações com IgG, que mantém-se inalterada na presença do radical 2-ME (SHUTHERLAND, 1980; WRIGHT e NIELSEN,1990).

A prova de fixação de complemento fundamenta-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento. Esta prova apresenta boa sensibilidade, alta especificidade e detecta preferencialmente IgG, principalmente da sub-classe IgG₁, que predomina em animais infectados (WRIGHT e NIELSEN,1990; GRASSO e CARDOSO, 1998). A prova de FC é realizada em placas em “U” com 96 poços, com leitura em uma hora. O método é mais laborioso se comparado a AAT e 2-ME. Desta forma, é realizado em número restrito de laboratórios, visto que exige controle rígido de todos os reagentes (antígeno, sistema hemolítico) [PAULIN, 2003]. A técnica detecta precocemente IgG₁ no soro em torno do 14^o dia e também é capaz de revelar casos crônicos nos quais os níveis de IgM praticamente desapareceram e os níveis de IgG₁ são baixos, devido ao baixo limiar de detecção da prova (KRUIZE, 1975; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Os estudos realizados no Brasil com a brucelose em bubalinos praticamente estão restritos à comparação de reações dos animais em diferentes métodos sorológicos (RIBEIRO et al., 2001).

Inquérito sorológico da brucelose em bubalinos no estado de Goiás revelou 17,31% de animais positivos e 15,82 de suspeitos, em 199 amostras de soros examinadas pela prova de soroaglutinação em placa (COSTA et al., 1973). Sandoval et al. (1979) investigaram 992 soros provenientes de rebanhos bubalinos do estado de São Paulo, e encontraram prevalência de 4,33% e 5,69% para brucelose, respectivamente, nas provas de soroaglutinação rápida em placa e “card test”.

Feitosa et al. (1991) relataram 21,92% de animais reagentes em 8.845 bubalinos do estado de São Paulo, utilizando a prova do AAT, e salientaram

que a frequência de bubalinos reagentes foi superior a estudos similares em bovinos.

Na região do Vale do Ribeira, SP, Mathias et al. (1998) assinalaram 10,39% de bubalinos reagentes para brucelose em 462 animais, utilizando a prova de FC.

No estado do Pará, Lopes et al. (1999) e Molnár et al. (2002) encontraram, respectivamente, ocorrências de 17,52% e 3,44% de bubalinos reagentes utilizando a prova do AAT.

Alternativamente, tem-se investigado também o uso de vacinas com dose reduzida de *B. abortus*, no intuito de minimizar a interferência dos títulos residuais pós-vacinais no diagnóstico sorológico. No Brasil, Kuchembuck (1983) vacinou bubalinas adultas, experimentalmente, utilizando dose reduzida da vacina B19 (2×10^9 bactérias/dose, por instilação conjuntival). O autor concluiu que esta prática evitou a disseminação da doença, limitou a ocorrência de manifestação clínica nas fêmeas e reduziu o número de animais reagentes ao longo de seis meses após a vacinação. Porém, salientou a necessidade de estudos visando avaliar o declínio dos títulos residuais em bubalinas vacinadas, que poderiam interferir com as provas sorológicas convencionais preconizadas no diagnóstico no país.

São praticamente incipientes as investigações de acompanhamento do perfil sorológico de bubalinas vacinadas com a B19 no Brasil. Estudos desta natureza podem determinar a interferência provocada por Ig de origem vacinal nos testes sorológicos recomendados no PNCEBT (RIBEIRO et al., 2001), fornecendo subsídios à avaliação continuada das ações de controle e profilaxia, necessárias para o sucesso do programa.

A vacinação com a cepa atenuada B19 é recomendada para bezerras entre 3 a 8 meses de idade visto que estes animais ainda não são sexualmente maduros, impedindo a patogenicidade da cepa vacinal nas fêmeas vacinadas. Ademais, as bezerras vacinadas tornam-se negativas ao atingirem a idade de cobertura (NIELSEN, 2002). King e Frank (1961) afirmaram que 90% das fêmeas vacinadas entre 3 e 8 meses resultaram negativas em testes sorológicos convencionais após nove meses da vacinação. Portanto, a idade das fêmeas na época da vacinação é um fator limitante no uso da vacina B19, visto que em animais vacinados após oito meses de idade, os anticorpos

oriundos da vacinação não são diferenciados dos produzidos por linhagens de campo nas provas sorológicas de rotina (NIELSEN, 2002).

Domingues et al. (1992), no Brasil, acompanharam por 240 dias o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bubalinas, entre 3 a 8 meses de idade, vacinadas com a dose padrão da B19, utilizando dose reduzida (750×10^6 bactérias/dose, via subcutânea). Os autores observaram que 7,7% dos animais vacinados com a dose padrão ainda apresentavam título 100 na soroaglutinação rápida em placa aos 240 dias pós-vacinais, enquanto 45% dos animais possuíam título 25 no mesmo período, vacinados com dose reduzida.

Ribeiro et al. (2001) investigaram o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bubalinas entre 3 a 8 meses, vacinadas com a dose padrão da B19. Foi observado que os títulos sorológicos máximos nas provas convencionais de soroaglutinação rápida em placa e 2-ME ocorreram entre o 15^o e o 45^o dia após a vacinação e, na média, as fêmeas não apresentaram títulos após dez meses pós-vacinais na prova de 2-ME.

Considerando o impacto econômico da brucelose na criação de ruminantes domésticos, os reflexos da doença enquanto zoonose, do reduzido número de estudos em bubalinos no Brasil, particularmente relacionados ao acompanhamento sorológico da doença em animais vacinados de acordo com o PNCEBT; foi realizado o presente estudo com o intuito de investigar o perfil sorológico de fêmeas bubalinas entre 3 a 8 meses de idade, vacinadas com a dose padrão da vacina B19, utilizando as provas sorológicas recomendadas pelo PNCEBT, com vistas a fornecer subsídios para o diagnóstico e controle da brucelose bubalina.

3. OBJETIVOS

- **Geral**

Investigar o perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a B19, entre 3 a 8 meses de idade, utilizando as provas do AAT, 2-ME e FC, recomendadas para o diagnóstico sorológico pelo PNCEBT.

- **Específicos**

- Avaliar o perfil sorológico dos animais frente à prova de triagem do AAT;

- Verificar o perfil sorológico dos animais nas provas confirmatórias do 2-ME e FC;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas no estudo 21 bezerras bubalinas (*Bubalus bubalis*), entre 3 a 8 meses de idade, da raça Murrah e mestiças, clinicamente sadias, criadas em sistema semi-extensivo, pertencentes à Área de Produção de Bubalinos do Departamento de Produção Animal da Fazenda Experimental Lageado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, SP.

4.2. Vacinação

A vacina utilizada constituiu-se de produto comercial, preparado com a cepa padrão B19 (*B. abortus*), atenuada, liofilizada, com teste de unidades bacterianas viáveis dentro do padrão preconizado pela (WHO, 1985), verificado pelo método de contagem viável, conforme Bier (1985) e com resultado negativo no teste de esterilidade para outros microrganismos.

Todos os 21 animais foram vacinados via subcutânea, atrás da escápula, na região das costelas, com dose de 2 mL. Antes da vacinação foi realizada anti-sepsia local utilizando álcool (70%) iodado (1%). No momento da vacinação, a vacina foi acondicionada entre 4°C a 8°C, utilizando isopor e gelo reciclável, conforme orientação do fabricante.

Não foi estabelecido grupo controle não vacinado, em virtude da obrigatoriedade da vacinação do rebanho da FMVZ.

4.3. Colheita das amostras de sangue

As amostras de sangue de todos os animais ao longo do estudo foram colhidas da veia jugular, em volume de 10 mL, após anti-sepsia local (álcool a 70%, iodado a 1%), com vistas a obtenção de soro para as provas diagnósticas. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente, "overnight". Em seguida, o soro sanguíneo foi cuidadosamente separado do coágulo, evitando hemólise. Os soros obtidos foram aliquotados em duplicata em ependorfes de 2 mL e estocados à temperatura de congelamento (-20°C), até o momento da realização dos testes

Antes da vacinação, foi realizada a colheita de sangue dos 21 animais, constituindo-se no dia zero do estudo.

As quatro colheitas subseqüentes ao dia zero foram realizadas em intervalos de 15 dias (15^o, 30^o, 45^o e 60^o dias pós-vacinação) e, em seguida, em intervalos de 30 dias, perfazendo assim 90^o, 120^o, 150^o, 180^o, 210^o, 240^o, 270^o, 300^o, 330^o, 360^o, 390^o, 420^o, 450^o, 480^o, 510^o, 540^o, 570^o, 600^o, 630^o, 660^o, 690^o e 720^o dias pós-vacinais. Desta forma, foram realizadas 27 colheitas, resultando no acompanhamento dos animais por mais de dois anos de idade, conforme preconiza o PNCEBT (BRASIL, 2006).

4.4. Provas sorológicas

O diagnóstico sorológico foi realizado utilizando as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT) corado com rosa bengala, 2-mercaptoetanol (2-ME) e a prova de fixação de complemento (FC).

A prova de fixação de complemento foi realizada no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, SP.

As demais provas foram realizadas no Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

4.4.1. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT)

A técnica do AAT foi realizada conforme recomendação do PNCEBT do MAPA (BRASIL, 2009).

O antígeno consistiu de suspensão celular inativada de *B. abortus* (cepa 1119-3), na concentração de 8%, com pH 3,65, corado com rosa bengala, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, Curitiba, PR.

O soro e o antígeno permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos antes da realização da prova. Em seguida, foi depositado em placa quadriculada padrão, 0,03 mL do soro a ser testado e 0,03 mL do antígeno. A homogeneização do soro e antígeno foi realizada utilizando bastão de vidro, formando círculos de aproximadamente 2 cm de diâmetro. Durante quatro minutos foram realizados movimentos circulares na placa, na razão de 10-12 movimentos por minuto, e a leitura realizada após o término deste período, com o auxílio da caixa de luz indireta de fundo escuro.

Os resultados foram interpretados a partir da presença de reação de aglutinação, indicado pela formação de grumos nos animais reagentes e ausência dos mesmos nos animais não reagentes.

4.4.2. Prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME)

A prova do 2-ME constitui na realização e interpretação em paralelo dos testes de soroaglutinação lenta em tubos (SAL) e 2-mercaptoetanol (2-ME) (anexo 1), conforme recomendação do PNCEBT do MAPA (BRASIL, 2009).

4.4.2.1. Teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAL)

O teste de SAL foi realizado conforme recomendação do PNCEBT do MAPA (BRASIL, 2009).

O antígeno utilizado consistiu de suspensão inativada de *B. abortus* (cepa 1119-3), na concentração de 4,5%, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, Curitiba, PR.

O soro e o antígeno permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos antes da realização da prova. Em seguida, o antígeno para a soroaglutinação lenta em tubos foi diluído 100 vezes em solução salina a 0,85%, contendo 0,5% de fenol, resultando na contração final de 0,045% do antígeno.

Com a pipeta regulável os soros foram dispostos em tubos previamente identificados, nos quais foram depositados 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL e 0,01 mL. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 2 mL do antígeno na concentração de 0,045% em salina fenicada (0,5% de fenol), perfazendo, respectivamente, as diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Os soros que apresentaram título 200 foram desdobrados nas diluições subseqüentes (ao dobro), até a extinção dos títulos. Os tubos foram tampados com rolhas de cortiça e incubados em estufa a 37°C e, após 48 horas (+/- 3 horas), foi realizada a leitura.

Foram considerados reagentes os soros que apresentaram sobrenadante claro e sedimento no fundo do tubo que, após leve agitação do mesmo, mostraram a formação de grumos destacados. Foram considerados incompletos os soros com sobrenadante turvo e presença de sedimento no fundo do tubo, enquanto os soros não reagentes apresentaram sobrenadante turvo sem a presença de sedimento no fundo do tubo (BRASIL, 2009).

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

O teste do 2-ME foi realizado conforme recomendação do PNCEBT do MAPA (BRASIL, 2009).

O antígeno utilizado foi o mesmo da SAL, constituído de suspensão inativada de *B. abortus* (cepa 1119-3), na concentração de 4,5%, produzido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, Curitiba, PR.

O antígeno para o teste de 2-ME foi diluído 50 vezes em solução salina a 0,85% sem a adição de fenol, resultando na concentração final de 0,09% do antígeno.

A solução de 2-ME a 0,1M recomendada para o teste foi obtida pela adição de 7,8mL de 2-ME a 992,2mL de solução salina (0,085%) não fenolada.

Com a pipeta regulável os soros foram dispostos em tubos previamente identificados, nos quais foram depositados 0,08 mL, 0,04 mL, 0,02 mL e 0,01 mL, aos quais se adicionou 1mL de solução de 2-ME a 0,1M (preparada conforme descrito acima).

Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 1 mL do antígeno de *B. abortus* (0,09%) a solução de 2-ME, resultando na concentração final do antígeno de 0,045%, perfazendo, respectivamente, as diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Os soros que apresentaram título 200 foram desdobrados nas diluições subseqüentes (ao dobro), até a extinção dos títulos.

Os tubos foram tampados com rolhas de cortiça e incubados em estufa a 37°C. Após 48 horas (+/- 3 horas) foi realizada a leitura.

Foram considerados reagentes os soros que apresentaram sobrenadante claro e sedimento no fundo do tubo que, após leve agitação do tubo, mostraram a formação de grumos destacados. Foram considerados incompletos os soros com sobrenadante turvo e presença de sedimento no fundo do tubo, enquanto os soros não reagentes apresentaram sobrenadante turvo sem a presença de sedimento no fundo do tubo (BRASIL, 2009).

4.4.3. Prova de fixação de complemento (FC)

A prova de fixação de complemento em microplaca, bem como a titulação da hemolisina, complemento e antígeno foram realizados de acordo com Alton, (1988) e Paulin et al. (2002). Foram utilizados soro de cobaio como complemento e antisoro de coelho para o sistema hemolítico.

As reações foram realizadas em microplacas de fundo em “U”. Foram utilizados 25µL de soro (diluição inicial de dois), com igual volume de antígeno e soro de cobaio, contendo cinco unidades de complemento capazes de hemolisar 50% das hemácias de carneiro sensibilizadas pela hemolisina. As microplacas foram incubadas por 30 minutos em estufa bacteriológica a 37°C. Em seguida, o mesmo volume de sistema hemolítico foi utilizado, incubando novamente a placa por mais 30 minutos.

O título do soro foi obtido determinando a recíproca da diluição na qual ocorreu fixação de 50% de complemento. O resultado foi convertido em Unidades Internacionais (UI) considerando positivos soros com títulos iguais ou acima de 20 UI (ALTON, 1988; PAULIN et al., 2002).

5. RESULTADOS

Os Quadros 1 a 5 e Figuras 1 a 6 apresentam os resultados do perfil sorológico das bezerras vacinadas entre 3 a 8 meses com a B19, ao longo do acompanhamento por 720 dias pós-vacinais.

No dia zero de estudo - que coincide com a vacinação -, todos os animais foram negativos em todas as provas (Quadros 1 a 5).

Na prova do AAT, aos 15 dias pós-vacinais, 20 (95,2%) dos 21 animais vacinados apresentaram-se reagentes. Nesta prova um (4,8%) animal mostrou-se reagente somente no 60^o dia pós-vacinal (animal 20). Entre o 60^o e 120^o dias pós-vacinais todos os animais foram reagentes. Aos 150 dias de acompanhamento, dois (9,5%) animais não se apresentaram reagentes (Quadro 1). Entre o 180^o e 240^o dias pós-vacinais foi observado declínio acentuado do número de animais reagentes (Quadro 1; Figura 1). No 270^o dia pós-vacinal, somente um (4,8%) animal mostrou-se reagente e, aos 300 dias de acompanhamento, nenhum animal foi encontrado reagente na prova de AAT, permanecendo não reagentes até os 720 dias de acompanhamento (Quadro 1; Figura 1).

Na prova do 2-ME (SAL+2-ME), todos as bezerras acusaram reação negativa no dia zero nos testes de SAL e 2-ME (Quadros 2 e 3).

No teste de SAL, aos 15 dias pós-vacinais foi observado o maior título nos animais (800) [Figura 2], embora uma (4,8%) bezerra (n^o 20) não tenha mostrado reação e tenha permanecido não reagente até o 45^o dia pós-vacinal (Quadro 2). No 60^o dia após a vacinação todas as bezerras mostraram-se reagentes. Entre o 90^o e 270^o dias de acompanhamento, os animais acusaram declínio gradativo dos títulos (Quadro 2; Figura 2). Aos 300 dias pós-vacinais somente seis (28,6%) animais apresentaram títulos 25 e, aos 420 dias de acompanhamento, todas as búfalas acusaram ausência de reação no teste de SAL, permanecendo não reativas até os 720 dias de acompanhamento (Quadro 2; Figura 2).

No teste de 2-ME, entre o 15^o e 45^o dias pós-vacinais foi encontrado o maior título (400) nos animais, embora duas (9,5%) bezerras (animais 11 e 20) não tenham mostrado reação. Destas, uma permaneceu não reagente até o 45^o dia pós-vacinal (animal 20) [Quadro 3]. No 60^o dia após a vacinação todas as bezerras mostraram-se reagentes. Entre o 90^o e 180^o dias de

acompanhamento, os animais acusaram declínio gradativo dos títulos (Quadro 3; Figura 3). Aos 210 dias pós-vacinais somente dois (9,5%) animais apresentaram título 25 e, no 360º dia após a vacinação, todas as búfalas acusaram ausência de reação no teste de 2-ME, permanecendo não reagentes até os 720 dias de acompanhamento (Quadro 3; Figura 3).

Na interpretação da prova de 2-ME (SAL+2-ME) - na qual segundo a normativa do PNCEBT são avaliados em conjunto os resultados dos testes de SAL e 2-ME (Anexo 1), aos 15 dias pós-vacinais 19 (90,5%) animais apresentaram-se reagentes. Entre o 30º e 45º dias de acompanhamento, somente uma (4,8%) bezerra (nº 20) não acusou reação na prova e, aos 60º dias pós-vacinais, todos os animais foram reagentes (Quadro 4; Figura 4). Entre o 150º e 240º dias pós-vacinais foi observado o declínio do número de búfalas reagentes, particularmente acentuado entre o 180º e 210º dias de acompanhamento. Do 240º ao 330º dias pós-vacinais, somente um (4,8%) animal mostrou-se reagente na prova de 2-ME (SAL+2-ME). No 360º dia, nenhum animal apresentou reação permanecendo não reagente até os 720 dias de acompanhamento (Quadro 4; Figura 4).

Na prova de FC, aos 15 dias pós-vacinais apenas um (4,8%) animal não acusou reação (nº 20) [Quadro 5]. Entre o 30º e 90º dias de acompanhamento, todas as búfalas mostraram-se reagentes na FC (Quadro 5; Figura 5). Após 90 dias pós-vacinais foi observado declínio acentuado do número de animais reagentes e, no 240º dia de acompanhamento, somente uma (4,8%) bezerra (nº 9) foi reagente (Quadro 5). A partir do 270º dia nenhum animal foi reagente na FC, permanecendo não reagentes até o 720º dia de acompanhamento (Quadro 5; Figura 5).

A Figura 6 sumaria o perfil sorológico das búfalas vacinadas com a B19 nas provas sorológicas de AAT, 2-ME (SAL+2-ME) e FC ao longo dos 720 dias de acompanhamento dos animais. Foi observado que, de maneira geral, todos os animais mostraram-se não reagentes mais precocemente na prova de FC, aos 270 dias pós-vacinais, enquanto nas provas de AAT e 2-ME (SAL+2-ME) as búfalas acusaram ausência de reação, respectivamente, aos 300 e 360 dias após a vacinação.

Ao longo do estudo não foram observados animais com oscilações de títulos e/ou reações nas provas utilizadas (Quadros 1 a 5), tampouco nenhum

animal mostrou-se reagente ou com títulos residuais aos 720 dias de acompanhamento.

QUADRO 1 – Bezerras bubalinas reagentes na prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

Animais	Dias Pós-Vacinais																				
	0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	720			
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
17	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
18	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
20	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
21	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+ = animal reagente / - = animal não reagente

QUADRO 2 – Títulos de anticorpos detectados pelo teste de soroglutinação lenta (SAL) em bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

Animais	Dias Pós-Vacinais																				
	0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	720			
1	-	50	400	200	100	50	50	50	25	25	25	25	25	25	25	25	-	-			
2	-	400	400	200	100	100	50	50	50	25	25	25	25	-	25	-	-	-			
3	-	800	400	200	100	100	100	50	50	25	25	25	25	-	25	25	-	-			
4	-	400	200	100	50	50	50	50	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-			
5	-	800	400	200	100	50	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	200	200	100	50	100	25	25	25	-	-	-	-	25	-	-	-	-			
7	-	400	200	100	50	100	25	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-			
8	-	800	200	200	200	100	50	50	50	50	25	25	-	25	25	-	-	-			
9	-	800	400	200	200	200	100	100	100	50	50	50	25	25	25	25	-	-			
10	-	800	400	200	50	25	25	25	25	25	-	-	-	25	25	25	-	-			
11	-	25	100	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
12	-	50	200	200	100	50	50	50	25	25	25	25	25	-	-	-	-	-			
13	-	400	400	200	100	50	50	25	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-			
14	-	800	400	400	200	100	50	50	50	25	25	25	25	25	-	-	-	-			
15	-	400	200	200	100	100	25	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
16	-	800	400	200	100	100	50	50	25	25	25	25	-	-	-	-	-	-			
17	-	100	200	100	50	100	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
18	-	400	200	100	50	100	50	50	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-			
19	-	400	200	200	100	100	50	25	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-			
20	-	-	-	-	50	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	-	800	400	200	100	50	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

+ = animal reagente / - = animal não reagente

QUADRO 3 – Títulos de anticorpos detectados pelo teste de 2-mercaptoetanol (2-ME) em bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

Animais	Dias Pós-Vacinais																				
	0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	720			
1	-	50	200	200	50	50	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	-	400	200	200	50	100	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	-	400	200	200	50	100	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	-	50	100	100	25	50	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	-	50	200	200	50	50	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	50	100	100	25	50	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
7	-	50	100	100	25	100	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8	-	50	200	200	50	100	50	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-			
9	-	50	200	200	200	200	100	100	50	25	25	25	25	25	-	-	-	-			
10	-	50	100	200	25	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
11	-	-	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
12	-	50	200	200	100	50	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
13	-	400	400	200	100	50	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
14	-	400	400	400	200	100	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	-	50	200	200	100	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
16	-	50	200	200	50	100	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
17	-	25	100	100	25	50	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
18	-	50	100	100	25	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
19	-	25	100	200	100	100	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
20	-	-	-	-	25	25	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	-	100	200	200	100	25	50	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

+ = animal reagente / - = animal não reagente

QUADRO 4 – Bezerras bubalinas reagentes na prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME) vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

Animais	Dias Pós-Vacinais																				
	0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	720			
1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-			
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
11	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
12	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
13	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
14	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
17	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
18	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
19	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
20	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

+ = animal reagente / - = animal não reagente

QUADRO 5 – Bezerras bubalinas reagentes na prova de fixação de complemento, vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

Animais	Dias Pós-Vacinais																				
	0	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	720			
1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
11	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
14	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
15	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
17	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
18	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
19	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
20	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+ = animal reagente / - = animal não reagente

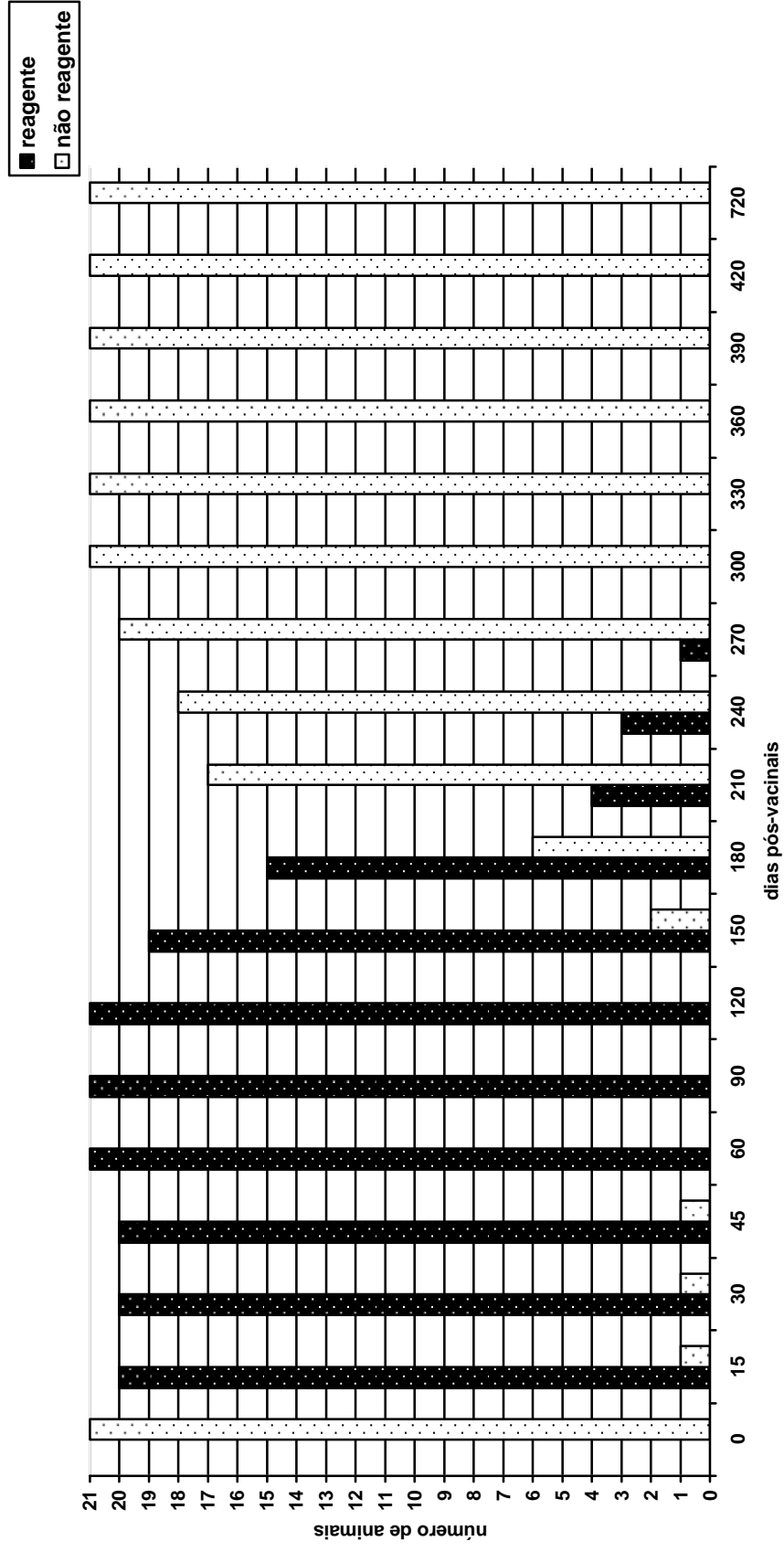


FIGURA 1 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

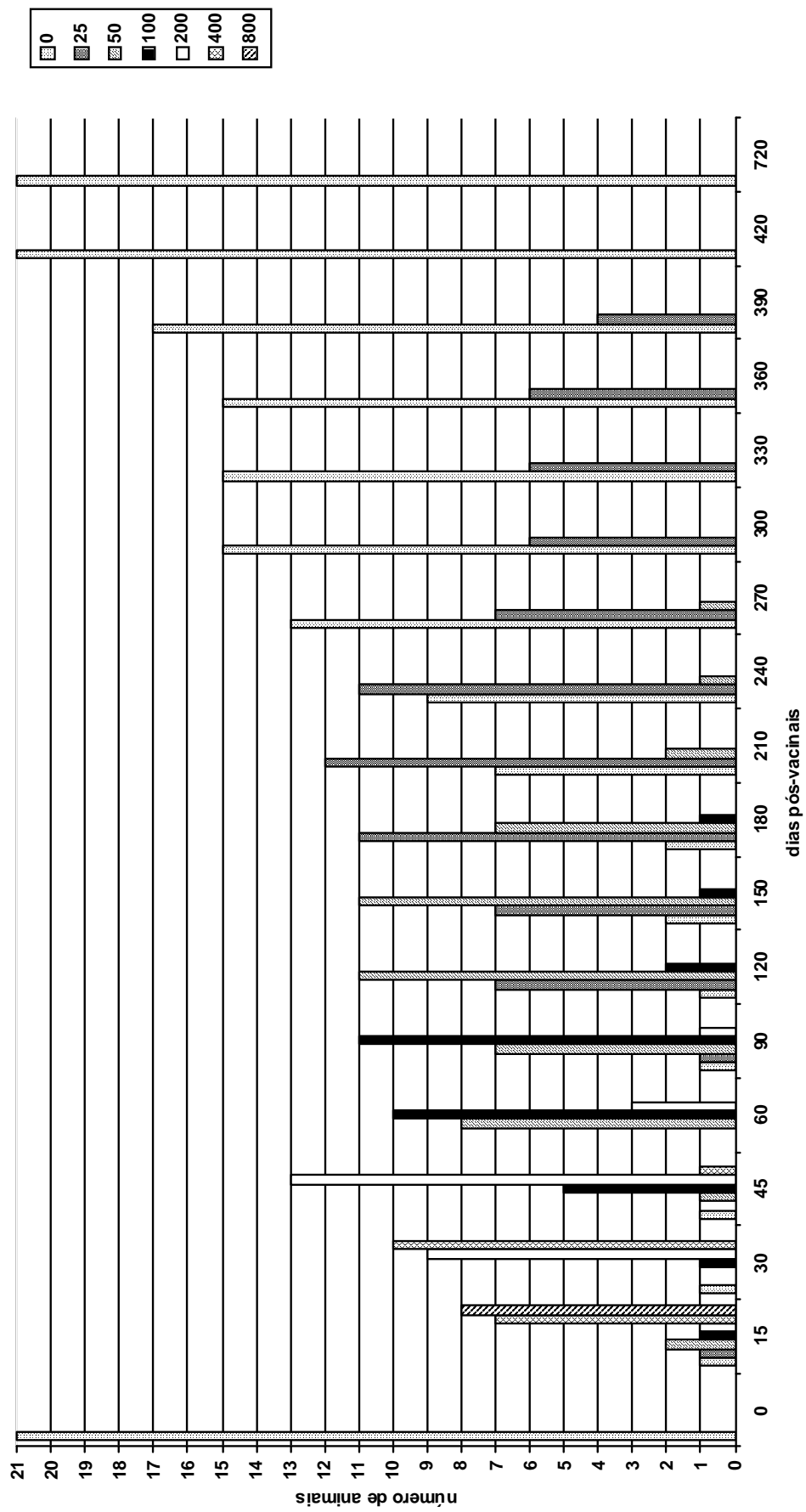


FIGURA 2 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, no teste de soroglutinação lenta (SAL), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

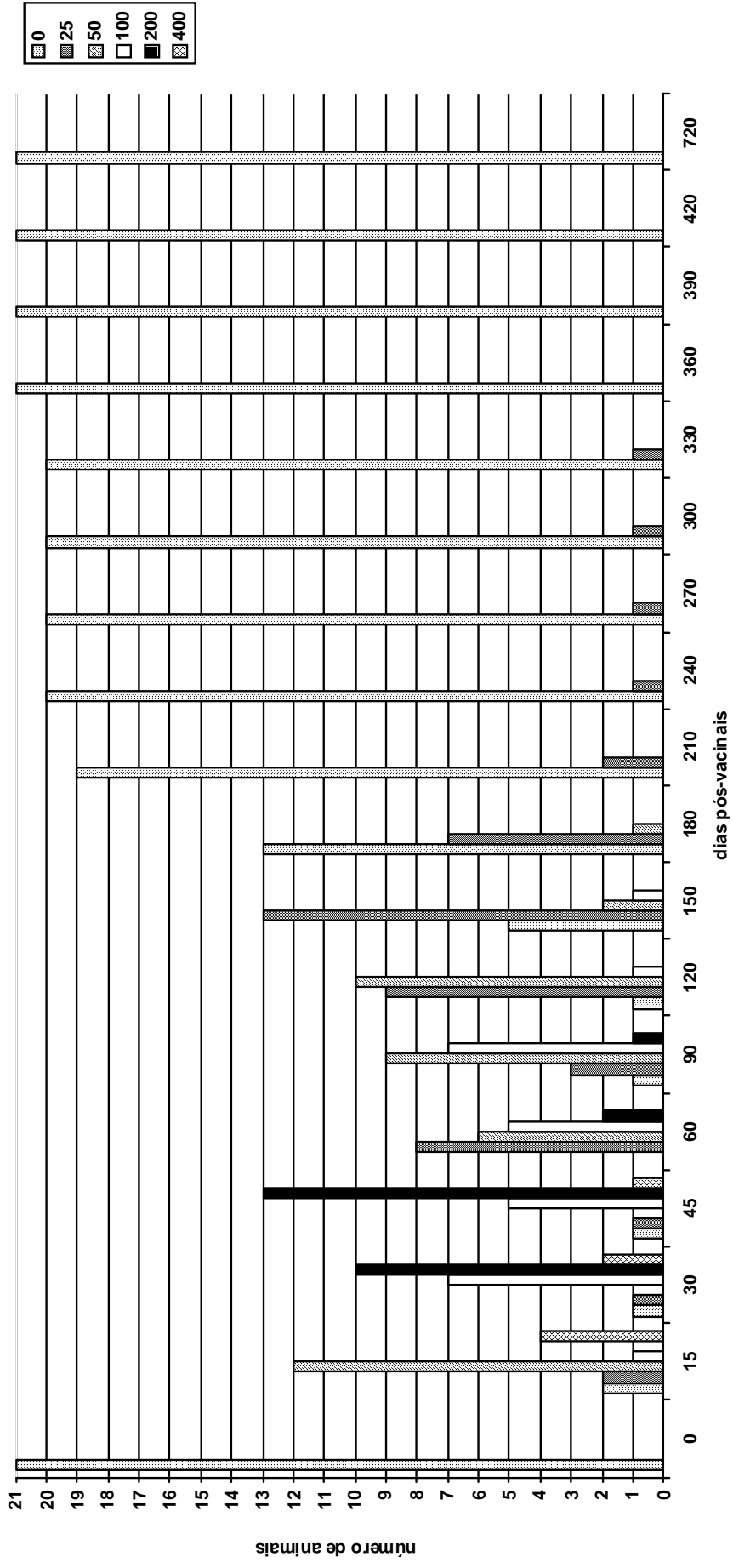


FIGURA 3 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, no teste de 2-mercaptoetanol (2-ME), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

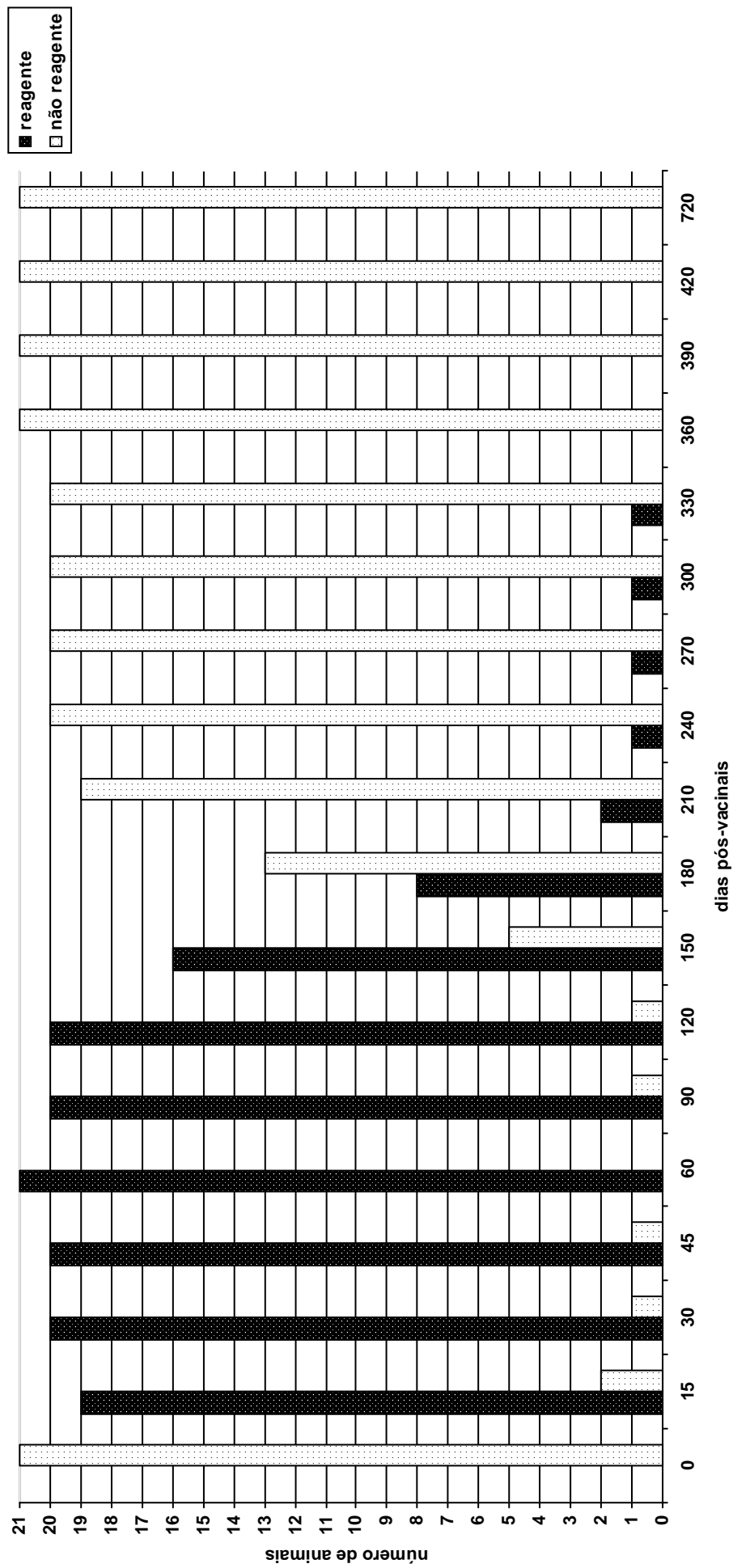


FIGURA 4 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova do 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

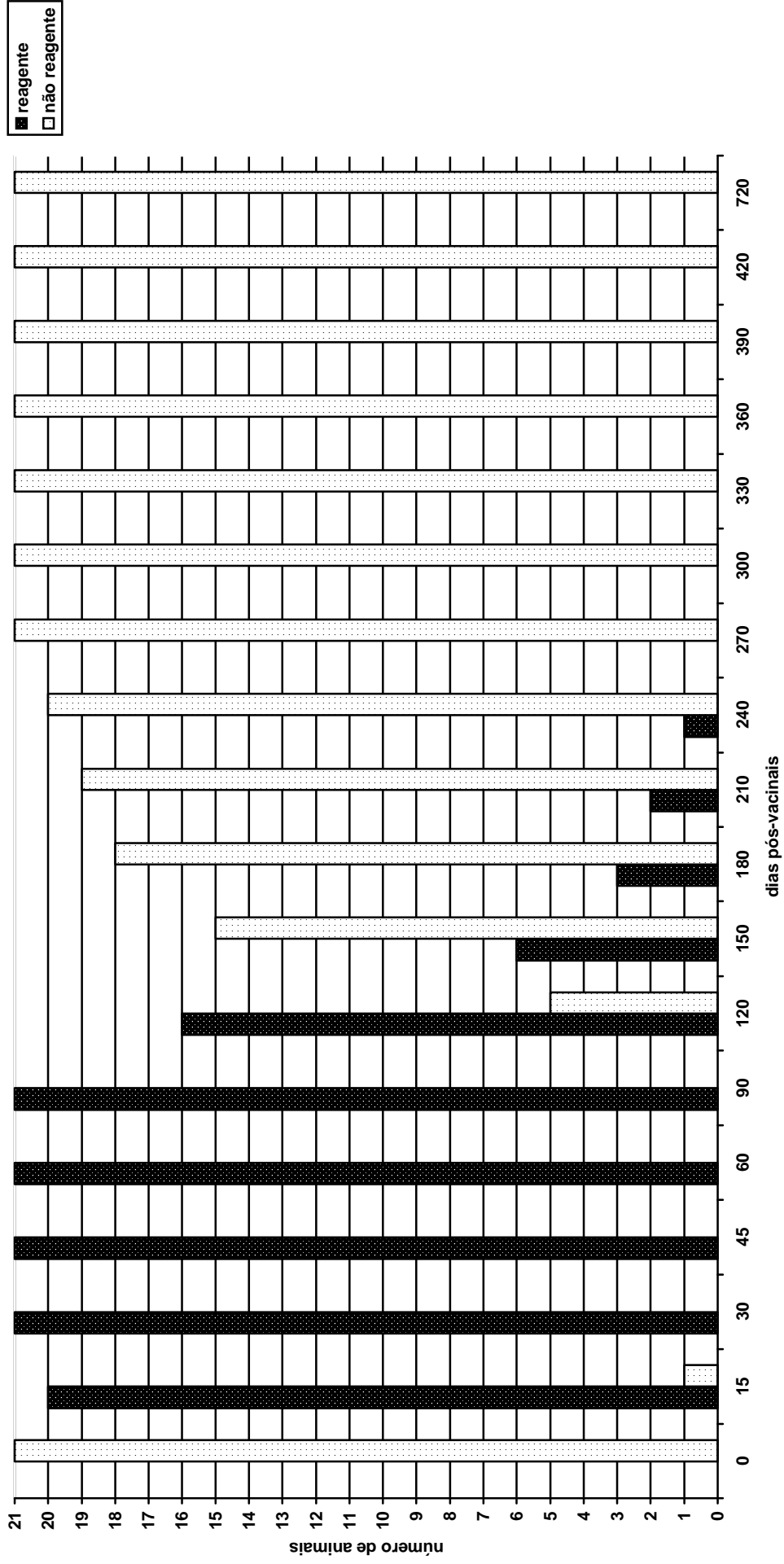


FIGURA 5 – Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 de *B. abortus* entre 3 a 8 meses de idade, na prova de fixação de complemento (FC), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

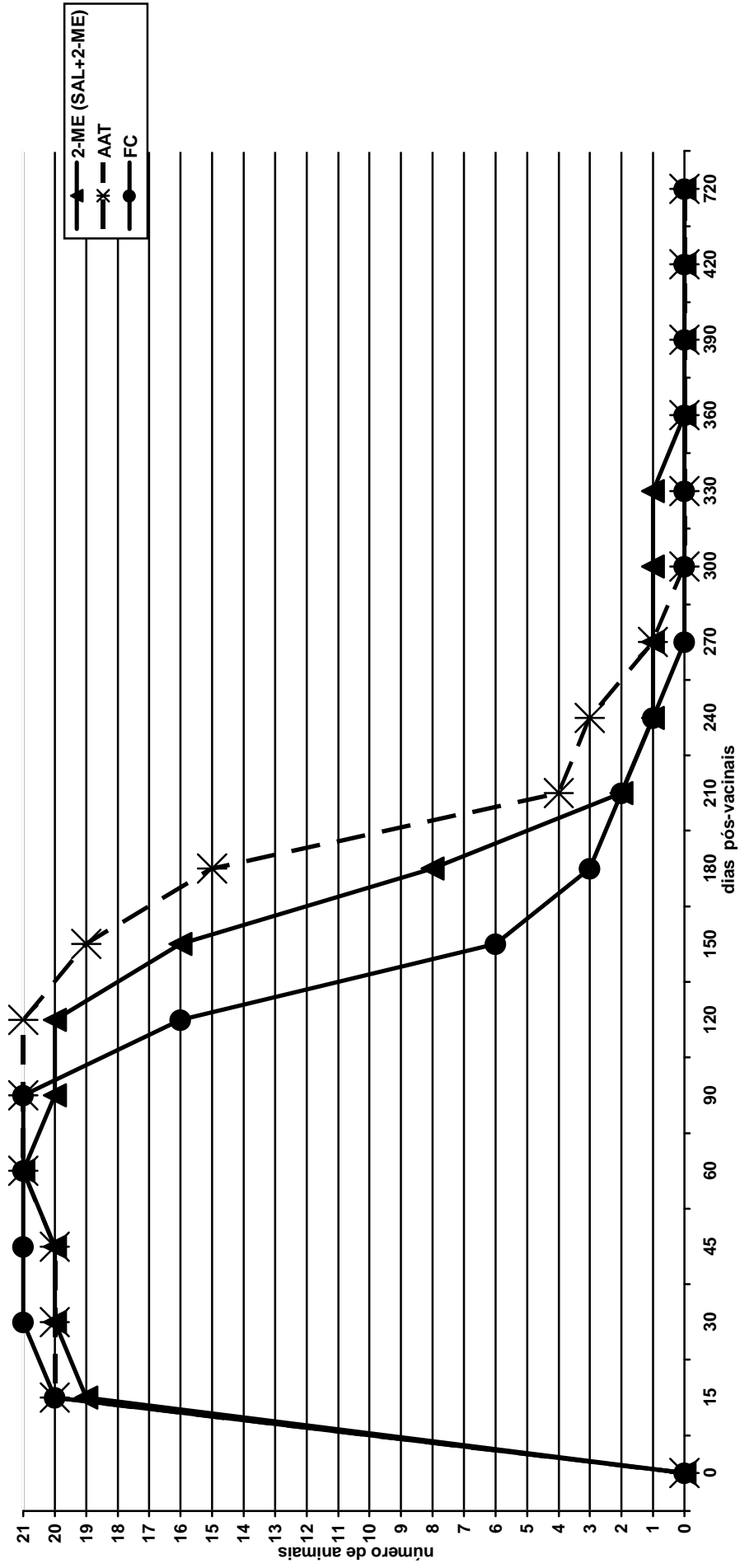


FIGURA 6 - Perfil sorológico de bezerras bubalinas vacinadas com a estirpe B19 entre 3 a 8 meses de idade, nas provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (SAL+2-ME) e fixação de complemento (FC), ao longo de 720 dias de acompanhamento. Botucatu, SP, 2009.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, vários fatores dificultam o estabelecimento de um programa eficiente de controle da brucelose em bubalinos. Dentre estes fatores podem ser destacados o grande número de fazendas distribuídas num amplo território, extensas áreas de fronteiras com diversos países, o nível desigual de informação e comprometimento dos proprietários com os programas sanitários, a elevada contagiosidade da doença entre os animais, a proximidade de criação ou co-habitação dos bubalinos com outros animais de produção, o acesso e adaptação desta espécie a diversos tipos de ecossistemas e o crescente aumento do plantel bubalino (PINTO et al., 2005). Faz-se necessário mencionar, também, a carência de estudos voltados ao sorodiagnóstico da brucelose em bubalinos, a despeito de volume considerável de investigações desta natureza envolvendo bovinos. Fosgate et al. (2002) destacaram certas peculiaridades da cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos, que justificam a necessidade de estudos específicos na espécie.

Apesar da escassez de estudos referentes à brucelose em bubalinos, as evidências da relevância dessa espécie na epidemiologia da doença podem ser aferidas pelas taxas de soroprevalência descritas no Brasil (MATHIAS et al., 1998, MOTTA et al., 2002) e no exterior (FOSGATE et al., 2002), que variam de 4 a 56,4%. A alta prevalência encontrada em certas regiões do Brasil indica a dimensão da brucelose como problema de saúde para a bubalinocultura e reforça a inclusão desta doença no PNCEBT do Brasil.

O PNCEBT possui como objetivos reduzir a prevalência da doença e criar número significativo de propriedades certificadas como livres ou monitoradas para brucelose, que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário. O êxito do programa exige que nenhum elo da cadeia epidemiológica da doença seja negligenciado, sob o risco de não atingir os objetivos almejados (BRASIL, 2006).

Em todos os países, os programas de controle e erradicação da brucelose em bubalinos e bovinos apóiam-se fundamentalmente na vacinação em massa de bezerras com a cepa B19, no sorodiagnóstico sistemático do rebanho e no abate sanitário de animais soropositivos (SCHURIG et al., 2002).

Até o momento, para o diagnóstico da brucelose em rebanhos somente os testes sorológicos são convenientes. O sorodiagnóstico se constitui em uma

das principais bases dos programas de controle da brucelose. Assim, a disponibilidade de métodos confiáveis, de uso massal, com custo acessível e que possam ser padronizados, são essenciais nos programas de combate a brucelose bubalina e bovina (MOLNÁR et al., 2002).

O PNCEBT do Brasil recomenda como provas oficiais o antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol e a fixação do complemento (BRASIL, 2006). Ademais, preconiza a vacinação sistemática das bezerras búfalas entre 3 a 8 meses, com a B19. A vacina atenuada B19 é um dos imunógenos mais utilizados em todo o mundo (RADOSTITS et al., 2007) e, até o momento, somente as vacinas atenuadas têm conferido imunidade satisfatória na profilaxia e controle da brucelose em bubalinos e bovinos. No entanto, B19 apresenta como inconveniente o risco de persistência de títulos pós-vacinais no sorodiagnóstico de bezerras vacinadas, que podem dificultar a diferenciação entre animais sadios e infectados, utilizando provas sorológicas convencionais (NIELSEN e DUNCAN, 1990; PAULIN e FERREIRA NETO, 2008).

No presente estudo, no dia da vacinação (dia zero) todos os animais acusaram ausência de reações nas três provas sorológicas, indicando ausência de contato com o microrganismo. Ademais, durante os 720 dias de acompanhamento nenhum animal demonstrou reação local ou sistêmica, mostrando a inocuidade da vacina.

Acima de 95% dos animais foram reagentes a AAT no 15^o dia pós-vacinal, com declínio a partir do 150^o dia e ausência de animais reagentes no 300^o dia de acompanhamento. Apesar da acidificação do antígeno no AAT limitar as reações de IgM que persistem em animais vacinados – priorizando reações com IgG que predominam em animais doentes –, maioria dos animais mostrou-se reagente na AAT nas primeiras semanas pós-vacinais. Esta prova mostrou também a ausência de animais com reações aglutinantes aos 300 dias pós-vacinais. Em contraste, Mac Millan (1990) referiu à persistência de animais reagentes na AAT em bezerras vacinadas com a B19.

No Brasil, Ribeiro et al. (2001) também observaram precocidade de reação na AAT nas primeiras duas semanas pós-vacinais em bezerras bubalinas vacinadas com a B19, bem como encontraram ausência de reação nesta prova aos 300 dias de acompanhamento, à semelhança do encontrado

no presente estudo. De maneira similar, Ribeiro et al. (1997) observaram em bezerras bovinas vacinadas com B19 entre 3 a 8 meses de idade reações em todos os animais aos 14 dias pós-vacinais e ausência de animais reagentes aos 308 dias, enquanto Koloda (2005) assinalou que 45 (100%) bezerras bovinas, tornaram-se não reagentes ao AAT aos 360 dias pós-vacinais.

No teste de SAL foram observados os maiores títulos nos animais aos 15 e 30 dias pós-vacinais, em consonância com os achados de Ribeiro et al. (2001) em bezerras bubalinas e Casas Olascoaga (1976), Sutherland (1980) e Ribeiro et al. (1997) em bezerras bovinas, que também encontraram títulos máximos nesta prova na segunda semana após a vacinação com a B19. Tal resultado provavelmente encontra justificativa na habilidade da SAL em detectar IgM, que atinge concentrações máximas no 13^o dia em bezerras vacinadas com a B19. Em estudo similar, Domingues et al. (1992) detectaram os maiores títulos em bezerras bubalinas vacinadas com a B19 entre 3 a 8 meses aos 30 dias pós-vacinais, embora tenham utilizado a prova de soroaglutinação rápida em placa, que também detecta IgM.

Ao avaliarmos individualmente o teste do 2-ME observamos que os títulos máximos se situaram entre o 15^o e 45^o dias pós-vacinais. Este achado concorda com Ribeiro et al. (2001) que conduziram estudo similar em bubalinos e com Casas Olascoaga (1976) e Ribeiro et al. (1997) em bezerras bovinas. Todos estes autores também identificaram títulos máximos no teste do 2-ME entre a segunda e sexta semanas após a vacinação com a B19. Este achado provavelmente encontra reflexo na capacidade do teste do 2-ME em priorizar as aglutinações com IgG, que atinge o pico em bezerras vacinadas com a B19 entre o 28^o e 42^o dias pós-vacinais (BUTLER et al., 1981; PAULIN, 2003).

Na interpretação da prova do 2-ME – que segundo as normas do PNCEBT para bezerras vacinadas com a B19, preconiza a avaliação em paralelo dos testes de SAL e 2-ME – foi verificado que as bezerras búfalas acusaram declínio gradual das reações entre o 90^o e 180^o dias após a vacinação e, aos 360 dias de acompanhamento, nenhum animal apresentou reação na prova. Ribeiro et al. (2001) encontraram resultados equivalentes, constatando ausência de reação na prova do 2-ME aos 360 dias de acompanhamento em bezerras bubalinas vacinadas com a B19. Em contraste, Koloda (2005) observou maior precocidade na ausência de animais reagentes

frente ao 2-ME, aos 300 dias de acompanhamento, em bezerras bovinas vacinadas com a B19.

A FC tem sido utilizada como prova confirmatória em vários países que alcançaram o “status” de erradicação da doença (GRASSO-PAULIN, 2000). Esta prova se caracteriza por baixa influência de reações anticomplementares e menor reatividade de IgM, detectando predominantemente IgG, notadamente da subclasse IgG₁ (HILL, 1963; CHAPPEL, 1989). Nas 21 bezerras bubalinas vacinadas com a B19 no presente estudo, 95% foram reagentes na FC aos 15 dias pós-vacinais, com declínio acentuado do número de reagentes no 120º dia pós-vacinal, e ausência de reagentes no 270º dia de acompanhamento. Kruze (1975) referiu que a FC detecta precocemente IgG em torno do 14º dia, fato também observado no presente estudo, que revelou elevado número de animais reagentes, nesta prova, no 15º dia pós-vacinal.

Alton et al. (1978) referiram que a FC apresenta menor influência de Ig de origem vacinal, comparativamente às provas clássicas de soroaglutinação, fato que explicaria a maior precocidade de animais não reagentes (270 dias), entre as três provas utilizadas no estudo, após a vacinação com a B19. Achado similar foi descrito por Mathias et al. (2001) em bovinos vacinados com a B19, que observaram menor número de animais reagentes na FC, aos seis meses pós-vacinais, comparativamente a AAT no mesmo período.

Nas bezerras bubalinas a FC e AAT apresentaram maior precocidade na ausência de reações após a vacinação, comparativamente ao 2-ME. Apesar da prova do 2-ME priorizar reações com IgG, a realização do método preconiza o uso em paralelo da técnica de 2-ME e SAL, cuja última detecta IgM e IgG. A detecção de IgM na técnica de SAL - que compõe a prova de 2-ME - poderia justificar a menor precocidade da prova do 2-ME frente a FC e AAT nas bubalinas vacinadas, visto que a IgM tende a persistir em animais vacinados com a B19.

De forma geral, não foram observados animais reagentes após 330 dias de acompanhamento, tanto na prova de rotina ou triagem (AAT), quanto nas confirmatórias (2-ME e FC), ou seja, no máximo aos 19 meses de idade. Este resultado atende às normas do PNCEBT, que exige que fêmeas bubalinas vacinadas entre 3 a 8 meses de idade com a B19 sejam submetidas as provas sorodiagnósticas, de rotina ou confirmatórias, somente após 24 meses de

idade, no intuito de evitar o diagnóstico de Ig de origem vacinal, que dificultaria a diferenciação de reações provenientes de animais infectados.

Desta forma, os achados do presente estudo evidenciam que a influência da vacinação na interpretação das provas sorológicas para brucelose recomendadas pelo PNCEBT foi de aproximadamente 11 meses pós-vacinais, fato que possibilita o uso destas provas com segurança após 24 meses de idade, sem a interferência de Ig de origem vacinal.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada possibilitaram as seguintes conclusões:

- Os maiores títulos ou números de animais reagentes nas três provas foram observados entre o 15^o e 60^o dias pós-vacinais, que coincidem com os picos de IgM e IgG, respectivamente, em bezerras vacinadas com a B19.
- Os animais apresentaram maior precocidade na ausência de reações frente à FC e AAT provavelmente decorrente da priorização de detecção de IgG por estas provas, que tende a declinar precocemente em animais vacinados com a B19.
- A menor precocidade na ausência de reações dos animais na prova do 2-ME (SAL+2-ME) decorreu provavelmente da influência da detecção de IgM no teste da SAL, visto que esta Ig persiste em animais vacinados com a B19.
- Tanto na prova de rotina (AAT) quanto nas confirmatórias (2-ME e FC) os animais apresentaram ausência de reações pós-vacinais no máximo aos 19 meses de idade, o que possibilita o uso destas provas após os 24 meses de idade, segundo as normas do PNCEBT, sem a interferência de Ig de origem vacinal com o uso da B19.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p.28-56.

ALTON, G.G. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: **Intitut National de la Recherche Agronomique**, 1988, 545p.

ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. **Aust. Vet. J.**, v.51, n.2, p.57-63, 1978.

ANDRIGHETTO, C. **Efeito da monensina sódica na produção, composição do leite e escore de condição corporal de búfalas Murrah no início da lactação**. Botucatu, 2004. 37p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

BARUSELLI, P.S. **Manejo reprodutivo de bubalinos**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1993. 46p. (Manual Técnico).

BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca, 1988. p.144-160.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

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

BOTELHO, A.P.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; SANTOS FILHO, A.S.; COELHO, R.M.S.; LIMA, E.T. Recuperação de *Brucella abortus* do leite 'in natura' procedente de vacas soropositivas dos municípios de Pedra e Venturosa-PE: aspectos de saúde pública. **Hig. Aliment.**, v.14, p.72-77, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina**. Brasília, 2006. 184p. (Manual Técnico).

BUTLER, J.E.; SEAWRIGHT, G.I.; MCGIVERN, P.L.; GILSDROF, M. Class and subclass antibody response of *B. Abortus* strain 19-vaccinated and field-strain-challenged cattle: evidence for a predominant IgG1 response in infected animals. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.137, p.790-791, 1981.

CAMPOS, V.M.X.; ARANGO, C. J. J.; PESADO, F.A. Evaluación financeira de un programa de control de la brucelose bovina en la Camarca Lagunera (1987 a 1990). **Vet. Med.**, v.24, p.127-34, 1993.

CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v.18, p.107-141, 1976.

CASTRO, A.C.; GONZÁLEZ, R.S.; PRAT, I.M. Brucellosis: uma revision practica. **Acta Bioquim. Clin. Latino-Am.**, v.39, p.203-216, 2005.

COSTA, E.O.; CURY, R.; ROCHA, U.F. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos no Estado de Goiás. Inquérito sorológico. **Biológico**, v.6, p.162-164, 1973.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, n.2, p.3-5, 1989.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; FESSEL, Y.N. Pesquisa de aglutininas anti-Brucella sp em soros de bezerras bubalinas vacinadas com dose padrão e reduzida de amostras B-19. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.44, p.491-500, 1992.

FARIA, J.F. Situação da brucelose no Brasil. **Comum. Cient. Fac. Méd. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.8, p.161-175, 1984.

FEITOSA, M.H.; BITAR, C.R.; GOMES, S.P. Bucelose: levantamento sorológico no estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. **Vet. Zootec.**, v.3, p.9-15, 1991.

FERRAZ, I.B.F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23,p.504-508, 1999.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Jornal a folha de São Paulo**. Disponível em <http://www.folhaonline.com.br>. Acesso em 02 de setembro de 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Bovine brucellosis**. Health, diseases cards. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 mai. 2003.

FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W.; JOHNSON, W.O.; HIETALA, S.K.; SCHRIG, G.G.; RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Am. J. Vet. Res.**, v.63, p.1598-1605, 2002.

GARCIA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the americas**. Paris: Office International des Epizooties, 1990.

GONZÁLEZ, R.A.; GONZÁLES-REYES, I.; FLORES-GUTIÉRREZ, G.H. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of México. **Can. J. Vet. Res.**, v.70, p.302-304, 2006.

GRASSO, L.M.P.S.; CARDOSO, M.V. Brucelose bovina. **Biológico**, v.60, p.71-79, 1998.

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

GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI, G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DI VENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. **Vet. Rec.**, v.21, p.88-90, 2001.

HILL, W.K. Standardization of the complement fixation test for brucellosis. **Bulletin Office Internationale Epizootique**. v.12, p.401, 1963.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M.; VEIGA, J.B.; LAU, H.D.; TOURRAND, J.F.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Some zoonosis in the Eastern Amazon. Case of Uruará, Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL HYGIENE, 10., 2000, Netherlands. **Anais...** Netherlands, 2000. p.204-210.

JOINT FAO/WHO. **Expert commite on brucellosis**. Genebra: World Health Organization, 1986. 132p.

JORGE, A.M. Desempenho em confinamento e características de carcaça em bubalinos. In: Barnabé V.H. **Bubalinos: sanidade, reprodução e produção**. Jaboticabal: Funep, 1999. p.51-67.

JORGE, A.M. Produção de carne bubalina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, n.2, p.84-95, 2005.

JORGE, A.M. Produção e qualidade da carne bubalina. *In*: Franzolin Neto R. (Ed.) Simpósio Paulista de Bubalinocultura, 2, 2001, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, 2001. p.1-47.

JORGE, A.M.; GOMES, M.F.I.V; HALT, R.C. et al. Efeito da utilização da somatotropina bovina recombinante (BST) sobre a produção de leite de búfalas. **Rev. Bras. Zootec.**, v.31, n.3, p.1230-1234, 2002

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; GUSTAFSSOON, H. The cow in endocrine focus before and after calving. **Reprod. Domest. Anim.**, v.39, p.217-221, 2004.

KING, N.B.; FRANK, N.A. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. **J. Vet. Am. Med. Assoc.**, v.131. n.7, p.100-1003, 1961.

KOLODA, M. **Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com cepa B19 de *Brucella abortus* (Frederick Bang, 1897)**. Paraná, 2005. 56p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

KRUZE, M.V. Metodos de diagnostico en el control de brucelosis bovina. II. Metodos serologicos. **Arch. Med. Vet.**, v.7, n.2, p.52 - 64, 1975.

KUCHEMUCK, M.R.G. **Estudo imunológico clínico do uso em dose reduzida da vacina contra brucelose (amostra B19) em búfalas adultas**. 1983. 74p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LACERDA, L.M.; ALVES, L.M.C.; MATHIAS, L.A.; RODRIGUES, A.L.B.; ALMEIDA, F.M. Brucelose em trabalhadores de matadouros do município de São Luís, MA, 1997. **Hig. Aliment.**, v.14, p.62-65, 1997.

LÁU, H.D. **Doenças em búfalos no Brasil, diagnóstico, epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 1999. 202p.

LÁZARO, N.S.; HOFER, E. Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serotype 9 and *Brucella spp* in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.16, p.39-43, 1996.

LOPES C.F.A.; MOLNÁR L.; MOLNÁR E. Avaliação soropidemiológica da brucelose em animais e humanos procedentes da zona Bragantina no Estado do Pará-Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.23,p.429-431, 1999.

LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiol. Infect.**, v.136, p.496-503, 2008.

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

MADELLA-OLIVEIRA, A.F.; QUIRINO, C.R.; ADONA, P.R.; PACHECO, A. Aspectos da comercialização de carne e leite de bubalinos na região Norte Fluminense. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** , v.29, p.53-54, 2005.

MARQUES, J.R.F.; CARDOSO, L.S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, 1997. p.10-221.

MARQUES, J.R.F.; CARDOSO, L.S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, 1997. p.10-221.

MATHIAS, L.A.; CHAVES, L.F.; CHEN, A.A.; GIRIO, R.J.S.; VALÉRIO NETO, W. Evolução dos títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.4, 2001.

MATHIAS, L.A.; GIRIO, R.J.S.; DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesqui. Vet. Bras.**, v.18, p.111-114, 1998.

MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J.J.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.; PINTO, M.R.A.; RIBEIRO, M.G.; THIEBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTUJI, B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **Vet. Rec.**, v.156, p.147-148, 2005.

METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. Brucellosis. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. **Handbook of zoonoses**. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.

MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa vacinal (B19) ou de campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**.2004. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.22, p.41-44, 2002.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TURY, E.; SOUZA, J.S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.19, p.157-62, 1997.

MOTTA, P. M. C.; LEITE, R. C.; LOPES, L. B.; AMARAL, F. R.; PRADO, P. E. F.; LAGE, A. P. Brucelose e tuberculose em oito rebanhos de núcleo de bubalinos de Luz-Dores do Indaiá. **J. Vet. Am. Med. Assoc.**, v.151, p.1778-1783, 2002.

NARDI JÚNIOR, G. **Perfil de anticorpos anti-*Leptospira* spp em búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dois tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa)**. São Paulo, 2005. 89p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NARDI JÚNIOR, G.; GENOVEZ, M.E.; RIBEIRO, M.G.; CASTRO,V.; JORGE, A.M. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnostic of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. **Braz. J. Microbiol.**, v.38, p.363-368, 2007.

NICOLETTI, P. Brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenoly**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.271-274.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Arch. Med. Vet.**, v.27, p.9-17, 1995.

NIELSEN, K. Developend of Live Brucella Vaccines. In: ADAMS, L.G. **Advances in Brucellosis Research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.251-276.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.447-459, 2002.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.

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

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Vet. Microbiol.**, v.100, p.25-30, 2004.

OLASCOAGA, C.R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v.18, p.107-141, 1976.

OMER, M.K.; SKJERVE, E.; HOLSTAD, G.; WOLDEHIWET, Z.; MACMILLAN, A.P. Prevalence antibodies to *Brucella* spp. In cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. **Epidemiol. Infect.**, v.125, p.447-453, 2000.

PAULIN, L.M.S. Brucelose. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, p.239-249, 2003.

PAULIN, L.M.S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. Artigo de revisão: brucelose em búfalos. **Arq. Inst. Biol.**, v.75, p.389-401, 2008.

PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: situação atual.** Jaboticabal: Editora Funep, 2003. 154p.

PAULIN, L.M.S.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.41-47, 2002.

PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. **ARS Veterinária.** Jaboticabal, v.21, p.147-154, 2005.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology.** London: Wolfe, 2005. p.261-267.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** 10.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 2156p.

RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; NARDI JUNIOR, G.; KURODA, B.S.; JORGE, A.M. Perfil de aglutininas anti-*Brucella abortus* em provas de triagem e confirmatórias, em bezerras búfalas vacinadas com a B19. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001. Salvador. **Anais...** Salvador, 2001. p.160.

RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; RATTI, J.R.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.49, p.137-150, 1997.

SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.; BAKER, R. Is the erythritol the causa of abortion by brucellosis? In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. Res.491, p.34.

SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M.; GIORGI, W.; AMARAL, L.B.S.; MAZANTI, M.T. Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo. **Biológico**, v.45, p.209-212, 1979.

SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.479-496, 2002.

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

TAYLOR, J.P.; PERDUE, J.N. The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1977-1986. **Am. J. Epidemiol.**, v.130, p.160-165, 1989.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press, 1988. p.135-144.

UNITED STATES. Department of Agriculture. National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis facts about brucellosis**. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em: 10 ago. 2009.

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CÔRTEZ, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. USP**, v.11, p.25-36, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Joint FAO/WHO Expert Committee on brucellosis. **WHO. Tech. Rep. Ser.**, 740, p.58-66, 1985.

WRIGHT, P.; NIELSEN, K. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. **Advances in brucellosis research**. Texas: A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.