NAIRLÉIA DOS SANTOS SILVA

Estudo das vacinas contra brucelose bovina: revisão

São Paulo

2012

NAIRLÉIA DOS SANTOS SILVA

Estudo das vacinas contra brucelose bovina: revisão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

17/12/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2740
FMVZ

Silva, Nairleia dos Santos
Estudo das vacinas contra brucelose bovina: revisão / Nairleia dos Santos Silva. -- 2012.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,
2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto.

1. Brucelose bovina. 2. Vacinação contra brucelose. 3. Vacina B19. 4. Vacina RB51. I.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo das vacinas contra brucelose bovina: revisão", protocolado sob o nº 2836/2012, utilizando não utiliza animais, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Study of vaccines against bovine brucellosis: review", protocol number 2836/2012, under the responsibility Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Nairléia dos Santos

Título: **Estudo das vacinas contra brucelose bovina**: revisão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico ao meu pai, Francisco Antonio da Silva, o qual possibilitou e facilitou a realização de mais uma etapa da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Para Deus que me deu forças para passar pelas dificuldades e obter mais uma conquista.

À minha família: pai Francisco Antonio, mãe Neuza Maria, irmã Leidy e irmão Henrique, pelo amor retribuído.

A toda a família Imbroinise, especialmente Raffaele Imbroinise Netto (noivo) pelo amor, amizade, companheirismo e compreensão da ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, pela oportunidade de dividir seus conhecimentos e assim contribuir na realização dessa etapa da minha vida acadêmica.

À Prof. Dr^a Eugenia Márcia de Deus Oliveira (*in memorian*), por ter passado por minha vida e “plantado uma semente que germinou e desde então vem crescendo.”

À Prof. Dr^a Lara Borges Keid, também por aceitar a dividir seus conhecimentos, principalmente pela paciência e colaboração integral.

À todos os professores (as) do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da USP, muito obrigada pelas aulas e dúvidas elucidadas.

Às amigas e técnicas do laboratório de zoonoses bacterianas da USP, Gisele Oliveira Souza e Zenaide Maria Moraes. A técnica do laboratório biomol, Sheila Oliveira Souza. A técnica do laboratório de higiene alimentar Sandra. Ao técnico de laboratório Renatinho e Alexandre. Ao técnico do biotério Pedrinho. Ao técnico de informática Antonio. As funcionárias da copa: Carol, Cláudia e Marta, pela companhia e ajuda.

Às amigas e companheiras do laboratório de zoonoses: Cássia Ykuta, Viviane Cambuí, Vanessa Miranda Reis, Wanessa Basílio, Erika Hayashi, Amane Paldes, Flavia Morato, Flávia Carol, pelo companheirismo e apoio.

Aos secretários (as) do departamento VPS: Danival, Cristina e Virgínia pela gentileza e simpatia.

Aos amigos e funcionários da USP de Pirassununga: Prof. Dr. Rodrigo, Sr. Antônio, Ni, Rafael Françoso, Paulão e esposa, Cecy e família, Rui Silva, Bruno e ao casal Nathalia e Wilian.

A todos os funcionarios (as) da FMVZ/USP, especialmente às funcionárias da biblioteca da FMVZ da USP: Sr^a Neuza, Elza, Solange, Sr^a Elena, pelo auxílio e cordialidade. Aos funcionários (as) da secretaria de pós-graduação da FMVZ da USP, pelo auxílio e cordialidade.

Aos amigos e colaboradores que fiz na UFBA: Prof. Dr^a Alessandra Estrela, M.V. Maria das Graças Ávila, Sônia Laborda, Prof. Dr. Maurício Costa Alves da Silva, Prof. Dr. Joselito Nunes Costa, Prof. Dr^a Daniela Laranjeira, Prof. Dr^a Stella Barrouin de Melo, Larissa de Fátima Duarte, Ana Carolina Farias Costa, Catarina Bitencust, Sabyne Chistina Regis, Lorena Gabriela Rocha, Karine Damasceno, Mirian M. P. Cavalconti, Fernando Alzamora, Vanessa M. Reis, Zé Pinheiro, Carlos Humberto da Costa Filho, Priscila Damasceno, Virgínia Vagas, Natália Luchi, Thiago Sampaio, Marina Rossi, Eliandra Calado, Márcia Costa, Daniele Neves, João Paulo, Davi, Bárbara Paraná, Margot, Arquimedes, Soraia, Fernanda, Everaldo, Roger, Madiane, Luana, Rafaela Duplat, Lisa Nunes, Valdicéia, Jamile, Jáiro, Dani, Bel, Íris, Lilian (Liliboia), Sr. Marcos, Sr. Emanuel, pelos bons momentos, colaboração e amizade.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Dias, Túlio Vasco (Sanidade), Thiago Martins (Parasitárias), Marcos Gomes (Parasitárias), Sílvia Zanutto (Italiana), Danilo Saráiva (Parasitárias), Thais B. Lessa (Anatomia), Amália Regina (Parasitárias), Gi Magrão (Parasitárias), Bruno Bertassoli (Anatomia), Iracema Nunes (Biomol), Camila Nóia (Higiene), Marina Moreno (Sanidade), Sandra Salaberry (Bacteriologia), Cíntia Maria (Biomol), Chico (Parasitárias), Andréia

(Parasitárias), Hebert (Parasitárias), Igor (Parasitárias), Tati (Parasitárias), João (Parasitárias), Júlia (Parasitárias), Ricardinho (Parasitárias), Diego (Parasitárias), Bruna (Biomol), Aline (Biomol), Patícia (Biomol), Malheiros (Biomol), Frank (Biomol), Cíntia Godim (Biomol), Suely (Biomol), Juliana (Biomol), Carol (Biomol), Luiz (Biomol), Eveline (Bacteriologia), Fabiana Miragle (Sanidade), Paula (Sanidade), Jucélia (Sanidade), Márcio (Anatomia), Amilton (Amilton), Diego (Anatomia), pelos bons momentos.

Aos meus familiares: Tia Coi (Hildete Leal), Tio Dio (Adilton Leal) e Maria. As minhas queridas primas Emanuela Mota, Ana Meiruse, Érica Mota, Nara Leal e primos Tiago Leal, Jean Leal, Genival Leal e Amauri, Jamile Leal, Kamile Leal, pelo carinho.

Aos amigos (as) pessoais: Márcia Cristina Farias (praticamente irmã), Rita Fabiana de Souza, Luiz Coriolano Bahia, Conceição Bahia, Amanda Carneiro, Regina Santos, Eduardo Reale, Ivanete Araújo, Valquíria Sandes, Luciene Rocha e Ariclênes, Iolanda, Mércia, Demis pela amizade além do tempo e da distância.

Aos novos amigos Cruspianos: Leidiana Mendes, Markelly Fonseca, Flávinha Cristine da Silva, Renata Medeiros, Juliana Gonçalves, Luis Miguel, Fátima, Eleni, Gal, Alexandra, Débora, Teubislete Borges, Celso Borzani, Laura Bergamos, Roberto Parente, Pedro, Cleiton, Aline, Carol Erva, Danilo, Kalel Schibelsky, Mari e funcionários: Sr. Albertino, Sr. Ailton, Sr. Antonio, Sr. Luís, D. Maria, Maurício, Joyce, Lia e Robson, obrigada a todos (as) pela amizade, sei que a maioria desses, serão amigos (as) para sempre.

Por fim, mas não menos importantes, às minhas quatro crianças peludas que babam, lambem e mordem, como ninguém! A todos os Cruspets e animais que de alguma forma foram ou estão presentes em minha vida, ensinando-me, através da sutileza de um simples olhar e/ou gesto, o significado do amor incondicional.

“Virá o dia em que matar um animal será considerado crime tanto quanto o assassinato de um homem.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

SILVA, N. S. **Estudo das vacinas contra brucelose bovina:** revisão. [Study of vaccines against bovine brucellosis: review.]. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A brucelose bovina é uma das zoonoses mais difundidas no mundo e provoca prejuízos econômicos decorrentes de problemas reprodutivos. Diversos investimentos e esforços têm sido feitos para preveni-la em várias partes do mundo. Em destaque no cenário da pesquisa mundial sobre brucelose, está a busca por uma vacina que seja inócua aos humanos e animais, garanta uma boa imunidade e, principalmente não interfira nos testes de diagnóstico. Desde a criação da primeira vacina contra brucelose, diversas outras foram desenvolvidas, no entanto, poucas foram aceitas e usadas em larga escala. As perspectivas para o futuro das vacinas contra brucelose, demonstram ser tão variadas quanto o seu passado. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é fazer uma reflexão sobre as vacinas contra brucelose considerando as principais vacinas desenvolvidas no passado, as utilizadas na atualidade e as perspectivas para a vacinologia contra brucelose.

Palavras-chave: Brucelose bovina. Vacinação contra brucelose. Vacina B19. Vacina RB51.

ABSTRACT

SILVA, N. S. **Study of vaccines against bovine brucellosis:** review. [Estudo das vacinas contra brucelose bovina: revisão]. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Bovine brucellosis is one of the most widespread zoonoses in the world and it causes economical losses due to reproductive problems. Several investments and efforts have been done to prevent bovine brucellosis in many parts of the world. The search for a vaccine which is harmless to both human and animals, ensure good immunity and , mainly, does not interfere in diagnostic tests is featured on the scene of worldwide research on brucellosis. Since the creation of the first vaccine against brucellosis, several others have been created. However, few have been accepted and widely used. The perspectives for the future of vaccines against brucellosis can be seen as varied as they were in the past. In this context, the aim of this study is to reflect on brucellosis vaccines considering the main vaccines developed in the past, the ones in use today and the perspectives for the future of vaccinology against brucellosis.

Keywords: Brucellosis. Vaccination against brucellosis. Vaccine S19. Vaccine RB51.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa do Brasil evidenciando a prevalência de animais positivos para brucelose bovina23

Figura 2 - Mapa do Brasil evidenciando a prevalência de rebanhos positivos para brucelose bovina24

LISTA DE ABREVIATURAS

45/20	Vacina inativada 45/20
a.C.	Antes de Cristo
B19	Vacina viva atenuada B19
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
d.C.	Depois de Cristo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FAO	Organização de Agricultura e Alimentação
EUA	Estados Unidos da América
GTA	Guia de Trânsito Animal
H-38	Vacina inativada H-38
LPS	Lipopolissacarídeo
M-104	Vacina viva atenuada M-104
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIE	<i>Organization International Epizooties</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB19	Vacina inativada Pilet-Bonneau
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose

RB51	Vacina viva atenuada RB51
REV1	Vacina viva atenuada REV1
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
S2	Vacina viva atenuada S2
SOD	Superoxidesmutase
TAHC	Texas Animal Health Commission
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 A HISTÓRIA DA BRUCELOSE	17
1.3 A BRUCELOSE NO BRASIL	19
2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	21
3 IMPACTO ECONÔMICO	25
4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E IMPORTÂNCIA DA VACINAÇÃO	27
5 VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE ANIMAL	29
5.1 VACINAS VIVAS OU ATENUADAS	29
5.1.1 Vacina B19	30
5.1.2 Vacina RB51	31
5.1.3 Vacina REV1	33
5.1.4 Vacina S2	34
5.1.5 Vacinas M	35
5.2 VACINAS MORTAS OU INATIVADAS	36
5.2.1 Vacina 45/20	36
5.2.2 Vacina H-38	37
5.2.3 Vacina PB	38
6 PERSPECTIVAS PARA O FUTURO DAS VACINAS	39
6.1 VACINAS GÊNICAS	39
6.2 VACINAS DE USO ORAL	41
6.3 VACINAS CONTRA BRUCELOSE HUMANA	43
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma antroponose, provocada por bactérias do gênero *Brucella*. São parasitas intracelulares facultativos que infectam células do sistema mononuclear fagocitário. Nos bovinos, a infecção tem curso crônico e está associada principalmente a problemas reprodutivos como abortamento, natimortalidade, ocorrência de crias fracas, aumento do intervalo entre partos e conseqüente diminuição na produção de leite e carne. Nos humanos, normalmente não afeta o sistema reprodutivo e os sintomas mais freqüentes são febre, calafrios, suores noturnos, dores articulares, fadiga, anorexia e cefaléia. O agravamento pode levar a artrites, bursites, dores reumáticas e eventualmente a meningoencefalites, neurites periféricas, artrites supurativas e endocardites vegetativas. Assim, por ser zoonose e causar prejuízos à pecuária de corte e leite, os países mais organizados têm adotado medidas de controle e erradicação da brucelose na população bovina (ACHA; SZYFRES, 1986; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Com os objetivos de baixar a prevalência e incidência da brucelose e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), lançou em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT), tendo a vacinação sua principal estratégia de controle da brucelose bovina. Desde a criação da primeira vacina contra brucelose, diversas outras foram criadas, no entanto, poucas foram aceitas e usadas em larga escala. Assim, o objetivo desse trabalho é fazer um estudo sobre as vacinas contra brucelose considerando as principais vacinas desenvolvidas no passado, as utilizadas na atualidade e as perspectivas para o futuro da vacinologia contra brucelose.

1.2 A HISTÓRIA DA BRUCELOSE

Exames em ossos datados de aproximadamente 750 a.C., procedentes do antigo Egito, mostraram evidências de sacroileíte e outras lesões osteoarticulares, comuns à brucelose (PAPPAS; PAPADIMITRIOU, 2007). Exames em restos mortais de romanos de Ercolano mortos em uma erupção vulcânica do Monte Vesúvio em 79 d.C., revelaram lesões típicas de brucelose em mais de 17% dos esqueletos das vítimas. Junto a esses restos mortais, também foi possível encontrar através da técnica de escaneamento utilizando microscopia eletrônica, queijo carbonizado feito de leite de ovelhas, onde havia presença de cocobacilos morfologicamente similares à *Brucella* sp. (CAPASSO, 2002; GODFROID, 2005).

Mas só em 1859, a doença foi reconhecida como uma entidade mórbida específica, quando Jeffery Allen Marston descreveu as características clínicas de sua própria infecção (VASSALO, 1992). Entretanto, só em 1884, o Dr. David Bruce foi enviado a Malta, onde começou a pesquisar a doença que debilitava os soldados britânicos e isolou um grupo de bactérias no tecido esplênico de soldados mortos pela doença. A bactéria foi inicialmente denominada "bacilo de Bruce", posteriormente *Micrococcus melitensis* e hoje se sabe que tratava-se da *Brucella melitensis* (NICOLETTI, 2002). O nome atribuído à bactéria possivelmente deve-se a sua descoberta na Ilha de Malta localizada no Mar Mediterrâneo, que em tempos anteriores da colonização inglesa, foi dominada pelos romanos e estes a chamavam de "Melita", fazendo analogia ao mel exclusivo daquela região que era produzido por abelhas de uma espécie endêmica, dando-lhe a conotação de "terra do mel" (PICKLES, 1998; MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007)

Em 1896, na Dinamarca, Bernhard Bang e Stribolt demonstraram que o aborto epizootico das vacas era provocado por um bacilo, e a doença ficou conhecida como a doença de Bang. As investigações continuaram e em 1905, com o médico maltês Dr. Temi Zammit, que infectou experimentalmente animais e descobriu que cabras aparentemente híginas, estavam infectadas. O Dr. Zammit associou este agente ao mesmo isolado por Bruce. Além disso, ele descobriu que a infecção era transmitida

aos seres humanos através do leite de cabra cru. Em 1906, a suspensão do leite de cabra da dieta das forças militares britânicas em Malta, determinou uma diminuição de casos da doença entre os militares (WYATT, 2005).

A bacteriologista americana Alice Evans, no ano 1918, publicou informação com evidência de que os microrganismos encontrados nas cabras, não eram passíveis de se diferenciarem morfológicamente por cultura ou testes bioquímicos dos microrganismos encontrados nas vacas. No entanto, testes de aglutinação e absorção expunham antígenos diferentes. Em 1920, Evans, conseguiu demonstrar que havia um parentesco entre os agentes bacterianos descritos por Bruce e Bang. (CARVALHO et al., 1995; MANTUR; AMARNATH; SHINDE, 2007).

A criação do gênero *Brucella* foi proposta por Meyer e Shaw (1920). Segundo *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (EUZÉBY, 1997) há dez relatos de espécies no gênero: *B. melitensis* (caprinos e ovinos) feito por Hughes em 1893; *B. abortus* (bovinos e bubalinos) feito por Schmidt em 1901; *B. suis* (suídeos) feito por Huddleson em 1929; *B. ovis* (ovinos) (BUDDLE, 1956); *B. neotomae* (rato do deserto) feito por Stoenner e Lackman em 1957; *B. canis* (caninos) feito por Carmichael e Bruner em 1968; *B. ceti* e *B. pinipedialis* (cetáceos e pinípedes) (FOSTER et al., 2007), *B. microti* (camundongo do campo) (SCHOLZ et al., 2008), *B. inopinata* (humanos) (SCHOLZ et al., 2010). As diferentes espécies de *Brucella* exibem preferências pelos respectivos hospedeiros à cima citados, porem pode haver infecção cruzada entre os patógenos e seus hospedeiros habituais. A *B. abortus* é a principal causadora da brucelose nos bovinos, embora também sejam suscetíveis a *B. melitensis* e *B. suis* (HIRSH; ZEE, 2003).

A *B. inopinata* cepa BO1T, última espécie até o momento comprovadamente descoberta, foi assim denominada devido ao seu isolamento “inesperado”, proveniente da infecção de uma senhora de 71 anos de idades decorrente do implante de prótese de silicone no seio. Inicialmente, as análises incluindo testes bioquímicos, TSA (teste de sensibilidade antimicrobiana), análise de ácidos graxos e análise molecular com presença de cópias múltiplas do elemento de inserção IS711 *Bruvella*-específico sugeriram que o isolado era um microrganismo semelhante aos do gênero *Brucella*. Mas a determinação da espécie, através de dados baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA e na análise sequencial multilocus,

demonstraram que a linhagem BO1 era uma cepa atípica e nova de *Brucella*, pois não estava relacionada as espécies descritas (SCHOLZ et al., 2010).

Ainda mais recente, Hofer et al. (2012) relataram que uma possível espécie nova de *Brucella* tenha sido isolada de linfonodos sub-mandibular de duas raposas vermelhas caçadas na Áustria em 2008. Tal hipótese é baseada na afiliação confirmada através do sequenciamento do gene *Brucella* 16S rRNA e detecção por PCR em tempo real de inserções gênicas específicas do gênero. No entanto, foram observados padrões atípicos na caracterização bioquímica desses isolados quando comparados com as características de *Brucellas* já conhecidas, sugerindo assim uma nova espécie. Para confirmar tal informação, mais testes serem realizados.

1.3 A BRUCELOSE NO BRASIL

Em 1914, Danton Seixas fez o primeiro diagnóstico de brucelose bovina no Rio Grande do Sul. Em 1917, Thomaz Pompeu Sobrinho observou casos de abortamento bovino, equino e ovino no Ceará, porém sem verificar um padrão de ocorrência epidêmica (ALMEIDA; D'ALMEIDA; HORN, 1988). O primeiro estudo sobre brucelose bovina no Brasil foi feito por Tinécio Icibaci que, através de pesquisas epidemiológicas e exames histopatológicos de fetos abortados, descreveu um foco de brucelose bovina ocorrido no Município de São Carlos, São Paulo, em 1922 (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Mello e Neiva em 1928, isolaram *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia abortado. Em 1931, Sílvio Torres verificou a existência de oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados. Em 1936, Desidério Finamor diagnosticou, através de sorodiagnóstico, a brucelose bovina pela primeira vez no Rio Grande do Sul e propôs plano para o seu combate (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Em 1950, Thiago de Mello, relataram a disseminação da

brucelose bovina por todo o Brasil, apontando para uma prevalência de 10% a 20%. Sendo que os índices mais altos estavam nas regiões de exploração leiteira do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (GARCIA-CARRILLO, 1987; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

A brucelose bovina é uma zoonose de difícil erradicação. Além de estar distribuída mundialmente, também está sujeita a mudanças devido a focos emergentes e/ou re-emergentes, causados por motivos socioeconômicos, em combinação com o aumento dos movimentos migratórios e a crescente importação e exportação de produtos de origem animal (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). Desde 1994, o Canadá, Japão, Austrália e Nova Zelândia são considerados livres (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Na Europa, foram declarados livres a Inglaterra, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Noruega, Áustria, Alemanha, Holanda, Chipre e Luxemburgo. A França, Grécia, Irlanda, Itália, Portugal e Espanha estão próximos da erradicação (GODFROID; KÄSBOHRER, 2002; POESTER et al., 2009; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

Outro país que caminha para a erradicação são os Estados Unidos da América (EUA), que desde 2000 não haviam mais registrado a brucelose nos rebanhos comerciais de bovinos (RAGAN, 2002), porém, após cinco anos de atividades de vigilância, a doença foi detectada no Texas e relacionada a reservatórios silvestres como alces e bisões, presentes em regiões próximas ao *Yellowstone National Park*, *Texas Animal Health Commission* (TAHC) (TAHC, 2011).

Em contraste com os países mais desenvolvidos, alguns países do norte e leste da África, Índia, Ásia central, Argentina, Paraguai e México têm apresentado dificuldades para controlar a brucelose bovina. Este último continua endêmico, embora tenha apresentado alguns avanços desde o início do controle em 1942 (LUANA-MARTINEZ; MEJÍA-TERAN, 2002; POESTER et al., 2009; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). Esse comportamento endêmico nos países em desenvolvimento é atribuído principalmente ao baixo investimento nos programas de controle (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

No Brasil, foi feito um estudo em 1975 envolvendo 19 estados brasileiros (BRASIL, 1977), onde estimaram a prevalência da infecção brucélica nos bovinos em 4,0% na

região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,5% na região Nordeste e 4,1% na região Norte. Contrastando com a importância da pecuária nacional, poucos estudos epidemiológicos de grande abrangência e uniformidade metodológica foram realizados como o supracitado. Segundo dados oficiais, no período de 1989 até 1998, a prevalência no Brasil sofreu uma elevação de 4,0% para 5,0% (BRASIL, 2001). Em Minas Gerais a prevalência reduziu de 7,6% (1977) para 6,7% (1980). No Rio Grande do Sul também reduziu de 2,0% (1977) para 0,3% (1986). Já em Santa Catarina, aumentou um pouco de 0,2% (1977), para 0,6% (1996). No Mato Grosso do Sul, a prevalência manteve-se estabilizada entre 6,3% (1977-1998) (BRASIL, 2001; POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

Passaram-se 34 anos para que um trabalho de magnitude nacional fosse realizado. Assim, em 2009 foram publicados dados detalhados sobre a situação epidemiológica da brucelose bovina em aproximadamente 82% do efetivo nacional, abrangendo 15 Unidades Federativas (Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo, e Tocantins) (ALVES et al., 2009; AMAKU et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009; CHATE et al., 2009; DIAS et al., 2009a,b; GONÇALVES et al., 2009a,b; KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009; MARVULO et al., 2009; NEGREIROS et al., 2009; OGATA et al., 2009; POESTER et al., 2009; ROCHA et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009; SILVA et al., 2009; VILLAR et al., 2009).

A brucelose bovina parece estar disseminada por todo o Brasil, com grandes heterogeneidades de prevalência entre os Estados e também dentro dos Estados. Existem unidades federativas com prevalência de focos muito baixa, como Santa Catarina e Distrito Federal. Estados com prevalência de foco muito alta, como Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Tocantins e Rondônia. Estados como Rio Grande do Sul, Paraná e Bahia têm heterogeneidades intra-estaduais, apresentando regiões com prevalências de focos muito baixas e outras com prevalências moderadas (Figura 1).

Figura 1 – Mapa do Brasil evidenciando a prevalência de animais positivos para brucelose bovina

Fonte: Ferreira Neto et al. (2012).

As baixas prevalências encontradas em Santa Catarina e Distrito Federal caracterizam essas unidades federativas como de baixo risco para transmissão da brucelose bovina e abre a possibilidade para implantação de estratégias de erradicação, com sistema de vigilância para detecção e saneamento de focos residuais. Essa mesma iniciativa poderia ser acompanhada pelo sul do Paraná, norte do Rio Grande do Sul e região central da Bahia, onde estão as áreas de baixo risco para brucelose nesses estados. Para os demais estados, o mais racional a fazer é rebaixar as prevalências com bons programas de vacinação usando as vacinas preconizadas pelo MAPA (Figura 2).

Figura 2 – Mapa do Brasil evidenciando a prevalência de rebanhos positivos para brucelose bovina

Fonte: Ferreira Neto et al. (2012).

3 IMPACTO ECONÔMICO

As perdas econômicas causadas pela brucelose são grandes, mas difíceis de estimar o seu exato valor financeiro. Embora na maioria dos países onde a brucelose esteja presente, exista um programa de controle e erradicação, e neles a doença seja de notificação obrigatória às autoridades de saúde animal, os números oficiais podem representar apenas uma fração da verdadeira ocorrência da enfermidade (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010), tornando ainda mais difícil a avaliação das perdas econômicas provocadas pela doença.

A escolha adequada das ações empregadas em um programa de controle e erradicação de uma doença é de fundamental importância para o sucesso do programa (DIJKHUIZEN; HUIRNE; JALVINGH, 1995). Sendo o ideal que os custos desse programa constituam-se inferior aos prejuízos causados pela doença. Dessa forma, a aplicação e aceitação das práticas preconizadas no programa tornam-se vantajosas e assim adotadas pelos produtores.

Na América Latina, as estimativas oficiais demonstram que as perdas anuais devido à brucelose bovina sejam aproximadamente de U\$600 milhões. Embora os programas de erradicação da brucelose possam ser caros, estima-se que seja economizado cerca de U\$7 para cada U\$1 gasto na erradicação. (ACHA; SZYFRES, 2001; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

No Brasil, a brucelose bovina causada pela *B. abortus* é a mais frequente, seguida pela *B. suis* em suínos, provocando uma diminuição entre 10% a 15% da produção de carne devido a distanciamento do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses; queda de 15% no nascimento de bezerros; queda de 10% a 24% na produção leiteira e aumento de 30% na taxa de reposição dos animais (FARIA, 1984; ACHA; SZYFRES, 1986). Assim, o impacto econômico da brucelose no país foi estimado em 32 milhões de dólares por ano (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002). Além dessas perdas diretas, há a desvalorização das propriedades acometidas pela doença; a vulnerabilidade dos produtos da pecuária brasileira às barreiras sanitárias,

comprometendo a competitividade no mercado internacional e as perdas decorrentes do caráter zoonótico da doença (PAULIN, 2003).

A Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2008) classifica a brucelose como doença da lista B, onde estão incluídas as enfermidades que têm importância econômica e social. Como os prejuízos provocados pela brucelose estão também relacionados à saúde pública, destaca-se o custo do diagnóstico laboratorial dos pacientes; seguido da terapia com os antibióticos (tetraciclina, gentamicina, rifampicina), que devem ser mantidos por pelo menos seis semanas, além do internamento hospitalar, quando necessário. Deve-se somar ainda, o afastamento e a perda da produtividade profissional por convalescença ou invalidez. Esses fatores tornam o tratamento da brucelose em humanos longo e oneroso (PAULIN, 2003).

Outra grande dificuldade são os escassos dados quantitativos financeiros relacionados a esses prejuízos causados pela brucelose na saúde pública. Este fato pode estar diretamente relacionado às subnotificações da doença em humanos, que por sua vez, é decorrente da inespecificidade dos sinais e sintomas da doença, dificultando assim o diagnóstico clínico. Investimentos em pesquisa no tocante a esses aspectos, valorizariam os debates e discussões sobre os impactos econômicos da brucelose de forma geral.

4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E IMPORTÂNCIA DA VACINAÇÃO

É paradoxal que a brucelose ainda seja uma doença que cause diversos danos, afetando muitos animais e pessoas em todo o mundo. O paradoxo reside no fato de que as medidas eficazes para controlar a brucelose são notoriamente conhecidas pela comunidade científica e também pelas autoridades responsáveis (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

Com um bom planejamento de defesa agropecuária, os programas de controle e erradicação da brucelose bovina, podem atingir uma redução significativa da prevalência depois de aproximadamente 20 anos de trabalho. Essas estratégias já conhecidas são resumidas em: vacinação das fêmeas, certificação de propriedades livres ou monitoradas, controle do trânsito de animais e sistema de vigilância específico (POESTER et al., 2009).

A vacinação é uma das estratégias mais importantes na estrutura de um programa, notadamente nos países em desenvolvimento e com prevalências importantes. O ideal é inicialmente rebaixar as prevalências com bons programas de vacinação, pois é barato, e só então incrementar as atividades de diagnóstico e sacrifício, previstas nos processos de certificação de propriedades. Isso reduziria os custos com reposição de animais (LAGE et al., 2008).

A experiência de vários países com a vacina B19, mostra que atingindo uma cobertura vacinal em torno de 80% das fêmeas, a prevalência nos animais será inferior a 2% (OIE, 2008). Para o Brasil, dados autóctones têm que ser produzidos para se conhecer o impacto da vacinação na redução da prevalência da brucelose bovina.

A certificação de propriedades livres de brucelose é regida por convenções internacionais da Organização Mundial de Saúde Animal. Basicamente, é feita pela realização de testes sorológicos em intervalos regulares, com sacrifício dos positivos até a obtenção de um rebanho constituído exclusivamente por animais negativos.

Para controle do trânsito animais são estabelecidas exigências, como a comprovação da vacinação contra brucelose das fêmeas para obtenção da Guia de Trânsito Animal (GTA); exame sorológico com resultado negativo para animais que participam de exposições; e também para os animais destinados a reprodução em trânsito interestadual (LAGE et al., 2006).

O estabelecimento de um sistema de vigilância específico é primordial à credibilidade das atividades dos programas de controle da brucelose. Ele ocorre principalmente pela certificação de propriedades, ações de monitoramento e fiscalização em pontos críticos do processo. Ou seja, o serviço veterinário oficial realizará em qualquer momento, diagnósticos por amostragem em propriedades certificadas e fará um acompanhamento direto dos testes finais que garantem o certificado de propriedade livre (LAGE et al., 2006).

Em um sistema de vigilância eficiente, é fundamental a integração entre as diversas esferas dos serviços oficiais de saúde pública. Estabelecendo assim, um fluxo de informações entre o serviço de inspeção nos abatedouros e o serviço de defesa sanitária animal (LAGE et al., 2006).

5 VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE ANIMAL

Dentre várias características desejáveis, a vacina ideal teria que: proteger contra os sintomas e a infecção 100% dos indivíduos vacinados com dose única; ser inócua para os animais e para o homem; induzir imunidade cruzada contra outras espécies de brucelas; não ter restrições quanto ao sexo ou à faixa etária; ser de fácil armazenamento, transporte e aplicação; ter baixo custo; não interferir no diagnóstico de rotina (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

5.1 VACINAS VIVAS OU ATENUADAS

São compostas por microrganismos vivos atenuados, que tem capacidade de multiplicarem-se no hospedeiro e assim estimular uma imunidade específica. Essa resposta imune ao microrganismo atenuado é semelhante àquela produzida pela infecção natural, pois o sistema imunológico não é capaz de fazer a diferenciação entre uma infecção de campo e uma inoculação vacinal. Porém, essa multiplicação não deve causar a doença, apenas infecção sub-clínica e auto-limitante, desencadeando principalmente uma resposta imunológica do tipo celular, importante contra bactérias intracelulares como as *Brucellas* sp. (TZARD, 2004). A seguir discutiremos, em ordem de importância atual de aplicabilidade, sobre as principais vacinas vivas desenvolvidas contra brucelose: B19, RB51, S2, M e M-104.

5.1.1 Vacina B19

Os esforços na busca de uma vacina ideal para brucelose bovina iniciaram em 1923 com Dr. John M. Buck, um bacteriologista veterinário. Em 1936, ele conduziu o primeiro teste a campo com bovinos utilizando a cepa vacinal de *Brucella abortus* denominada B19 (NICOLETTI, 2002) e é a principal vacina utilizada até hoje para bovinos. É do tipo viva atenuada sendo a principal vacina utilizada nos programas de controle na maioria dos países. Foi desenvolvida, nos EUA acidentalmente, por um esquecimento do meio de cultura bacteriano em temperatura ambiente por cerca de um ano (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

A B19 também foi a primeira vacina contra brucelose bovina a ser utilizada em larga escala, era conhecida como “anabortina”. Quando utilizada de forma adequada, nos testes clínicos confere proteção contra os sintomas e a infecção ao redor de 70%. Esse grau de proteção pode variar, estando fortemente associado à dose de desafio, que no teste clínico situa-se ao redor de 2 a 7 x 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias/animal e na situação de campo parece ser inferior (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A B19 tem as vantagens de proteger a fêmea por seis a sete partos com uma única dose, ter baixo custo de produção e ser de fácil manutenção, transporte e aplicação. Em um estudo envolvendo mais de 10.000 vacas com 7 a 8 meses de gestação a taxa de aborto induzido pela B19 foi baixa (menos de 1%) (BLASCO, 1997). Entretanto, se utilizada em animais adultos pode desencadear o aborto e produzir resultados falsos positivos no diagnóstico sorológico e também não é inócua para bovinos machos e humanos. Assim, sua aplicação deve ser limitada as fêmeas com idade entre três e no máximo oito meses de idade.

As limitações apresentadas pela B19, principalmente a impossibilidade de se vacinar animais adultos, estimularam muitos estudos visando sua melhoria. Essa atividade científica levou ao desenvolvimento de uma série de vacinas, dentre as quais se destacaram a REV1, a *B. suis* S2, a M, a 45/20, a PB19, H-38, RB51 e, atualmente

as vacinas ainda em fase experimental que usam tecnomoias moleculares (SCHRING et al., 1991; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2001; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; CURTA; SIMÃO; SEGER, 2008).

5.1.2 Vacina RB51

Excetuando-se as experimentais, nenhuma das citadas teve grande aplicação em programas de vacinação contra a brucelose bovina. A melhor vacina que surgiu até o momento foi a RB51 (*Rough Brucella* 51), obtida a partir de repiques sucessivos de uma amostra virulenta de *B. abortus* 2308 em meios contendo rifampicina, até a obtenção de cepa mutante rugosa, resistente à rifampicina, porém estável e atenuada (SCHURING et al., 1991). A diferenciação entre linhagens lisas e rugosas é a cadeia O, presente nas lisas e ausente nas rugosas. Esse é o componente mais superficial da membrana das brucelas lisas e o grande estimulador da produção de anticorpos aglutinantes e fixadores de complemento, pesquisados nos testes sorológicos para diagnóstico da doença (OLIVEIRA; AZEVEDO, 2001).

As *Brucellas* se dividem em lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) e rugosas (*B. ovis* e *B. canis*). O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa das brucelas, e centrifugamente formado por três domínios: o lipídio A, uma camada de oligossacarídeos densa (núcleo) e a cadeia antigênica O, ou simplesmente cadeia O (OLIVEIRA; AZEVEDO, 2001).

A vacina RB51 não produz anticorpos aglutinantes devido a uma deficiência no gene *wboA*, que codifica uma glicosiltransferase, enzima essencial à biossíntese do antígeno da cadeia O do LPS. A interrupção deste gene em linhagens de brucelas lisas resulta na conversão para um fenótipo rugoso, como comprovada na estirpe RB51 (VEMULAPALLI et al., 2000). Assim, pode ser usada na imunização de animais adultos, pois não tem restrição de uso pela faixa etária, possibilitando

acelerar o tempo necessário para se obter elevada cobertura vacinal na população bovina e assim reduzir mais rapidamente a prevalência da doença (AMAKU et al., 2009).

Estudos relatam que a proteção conferida pela RB51 foi similar à conferida pela B19 (STEVENS; OLSEN; CHEVILLE, 1995, POESTER et al., 2006) e que a RB51 provoca menos abortos que a B19, portanto mais segura para fêmeas em idade reprodutiva (PALMER et al., 1996). Entretanto, existem algumas incertezas em relação ao uso da RB51: não se sabe qual o tempo de proteção que uma única dose confere ao animal vacinado; sabe-se que ela é excretada no leite de animais adultos vacinados, porém não se conhece o risco real que isso significa para a população humana consumidora de lácteos, dado ser patogênica para humanos; existe a necessidade de maiores estudos sobre diagnóstico indireto e tratamento em humanos expostos acidentalmente.

A RB51 é uma vacina relativamente nova, com poucas experiências de utilização em massa. Assim, dados experimentais sobre o tempo de proteção que uma dose confere ao animal vacinado aparecerão em futuro próximo. Entretanto, tendo em vista o desempenho que essa vacina tem apresentado nos testes clínicos realizados até o momento e a sua constituição, é esperado um resultado semelhante ao da B19.

A excreção da RB51 pelo leite de vacas vacinadas já foi comprovada (UZAL et al., 2000; SAMARTINO et al., 2000; ARELLANO-REYNOSO et al., 2004; LEAL-HERNANDEZ et al., 2005), porém restam dúvidas sobre a duração do fenômeno, a quantidade de brucelas excretadas e se há uma estratégia de vacinação de vacas que poderia mitigar esse risco. Isso é de grande importância, pois a vacinação de vacas de leite com a RB51 poderá significar a insurgência de problemas de saúde pública.

Embora já existam técnicas para o diagnóstico indireto da infecção humana pela RB51, calcadas principalmente em métodos imuno-enzimáticos, há necessidade de maior investigação científica nesse tema, visando o estabelecimento de método de referência (ADONE; CIUCHINI; OLSEN, 2001; ASHFORD et al., 2004). A profilaxia pós-exposição à RB51 que o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)

preconiza para humanos é a doxiciclina (100 mg via oral, duas vezes ao dia, por pelo menos 21 dias). Havendo contraindicação para essa droga, recomenda trimetoprima+sulfametoxazol (160 mg/800 mg, via oral, duas vezes ao dia, por pelo menos 21 dias) (CDC, 2011).

Apesar dessas limitações, a RB51 tem sido a única vacina contra a brucelose bovina utilizada nos EUA, Chile, Uruguai e Costa Rica e também tem sido utilizada junto com a B19 no México, Venezuela, Equador, Paraguai, Peru, Colômbia e Brasil. Até o momento esses países não relataram problemas advindos da utilização dessa vacina. No Brasil, o MAPA, permitiu a comercialização e o uso, em condições especiais, da vacina RB51 através da Instrução Normativa nº 33, de 24 de agosto de 2007 (BRASIL, 2007). Tudo indica que o conhecimento sobre as consequências da utilização da RB51 em grandes populações evoluirá rapidamente nos próximos anos, podendo credenciá-la como uma vacina segura para essa finalidade.

5.1.3 Vacina Rev1

A Rev1 é uma vacina viva, atenuada de *B. melitensis* derivada de uma cepa virulenta que cresceu resistente a estreptomicina, perdendo sua virulência. Ela foi criada com o objetivo primário de estimular a proteção contra a infecção por *B. melitensis* em ovinos, cabras e carneiros e também protege contra a infecção por *B. ovis* (ELBERG; FAUNCE, 1957; FENSTERBANK; PARDON; MARLY, 1982). O uso da Rev1 em bovinos foi investigado e os resultados indicam que ela confere uma proteção melhor que a cepa 19 de *Brucella abortus*, no entanto a taxa de indução de aborto nos bovinos pode ser maior que a B19 (HORWELL; VAN DRIMMELEN, 1971; GARCIA-CARRILLO, 1980; SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

A cepa de *B. melitensis* Rev.1 é considerada atenuada quando em comparação com cepas de campo, mas não é inócua aos animais e dependendo da dose

administrada durante a gravidez, pode ocorrer abortos com frequência variável (ALTON; JONES; PIETZ, 1975; BLASCO et al., 1987; BARDENSTEIN et al., 2002). Nos carneiros a vacina parece ser avirulenta ou de baixa virulência (ERASMUS; BERGH, 1985).

A Rev1 embora altamente contagiosa para humanos e resistentes a um dos principais antibióticos usados no tratamento da infecção brucélica, é considerada como a melhor vacina disponível para o controle da brucelose ovina e caprina, especialmente quando administrada na dose padrão por via conjuntival. Outro importante problema, é que a resposta imune vacinal não pode ser diferenciada da infecção de campo, o que dificulta a dinâmica dos programas de controle. Diversas tentativas têm sido feitas para desenvolver novas vacinas vivas atenuadas rugosas de *B. melitensis*, que sejam desprovidas da cadeia O (BLASCO, 1997; GARIN-BASTUJI; BLASCO; VERGER, 1998; ADONE; FRANCA; CIUCHINI, 2008; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

5.1.4 Vacina S2

Nos anos cinquenta na China, uma linhagem de *Brucella suis* atenuada, chamada de *Strain 2*, foi obtida por transferência seriada de uma cepa virulenta de *B. suis* biovar 1 originária de um suíno. Esta cepa foi inicialmente desenvolvida para imunizar ovinos, caprinos e suínos por via oral durante a ingestão de água. Uma via de administração conveniente levando em consideração a vasta área de difícil acesso e semidesértica do Norte da China. Seu uso foi posteriormente estendido para outras espécies e também por via subcutânea (XIE, 1986; BOSSERAY; PLOMMET, 1990).

As autoridades chinesas relatavam sucesso no uso da S2 em condições de campo, mas as evidências da proteção em experimentos eram discutíveis, principalmente pela

falta do uso da vacina de referência, *B. melitensis* Rev1, nesses experimentos. Considerando estes resultados, a Organização de Agricultura e Alimentação (FAO) - Organização Mundial de Saúde (OMS) designou um comitê de peritos em brucelose para procurar evidências da eficácia da vacina S2 antes de recomendá-la às autoridades sanitárias dos países em desenvolvimento com condições de prevalência semelhantes (VERGER et al., 1995).

Assim, a eficácia da vacina S2 contra a infecção por *B. melitensis* foi avaliada em cobaias de laboratório por Bosseray e Plommet em 1990. A vacina Rev1, foi tomada como referência. A imunogenicidade, estimada pela contagem das células do baço dos camundongos vacinados e desafiados com a cepa virulenta *B. melitensis* H-38, foi semelhante para ambas as vacinas após 45 dias da vacinação, mas significativamente mais baixa para a vacina S2 após 150 dias. Assim, para conferir uma imunidade duradoura, a revacinação poderia ser necessária em ovinos vacinados com S2. A imunidade induzida pela S2 em carneiros, também parece ser menor contra a infecção por *B. ovis*, em contraste com a proteção da Rev1, altamente eficiente (BLASCO et al., 1993).

5.1.5 Vacinas M

Várias vacinas vivas foram usadas, embora não tenham sido amplamente adotadas, ou então seu uso tenha sido descontinuado após um determinado período por diversos motivos. Entre elas está a vacina "M", uma derivada mucóide de *B. suis*, e a M-104 uma vacina de uso oral, derivada de *B. abortus*, e de *B. suis*. Assim como a vacina S2, estas vacinas também foram usadas na China para prevenir a doença em ovinos, caprinos, bovinos e veados (XIE, 1986; LU; ZHANG¹ 1989 apud SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002, p. 482). Poucos estudos comparativos com

¹ LU, S. L.; ZHANG, J. L. Brucellosis in China. In: YOUNG, E. J.; CORBEL, M. J. **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. CRC Press, Boca Raton, chapter 13, p. 173-180, 1989.

essas vacinas e a B19 ou Rev1 foram relatados. Os que foram feitos, não indicaram eficácia protetora superior a conferida pelas vacinas consideradas de referência, contribuindo, assim para o desuso dessas vacinas (VERGER et al., 1995; SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

5.2 VACINAS MORTAS OU INATIVADAS

São imunógenos compostos por microrganismos mortos, isso significa que foram inativados por aquecimento térmico, agentes químicos ou irradiação UV, logo são incapazes de multiplicar-se no hospedeiro. Tal característica desencadeia uma resposta imunológica humoral, com pouca ou nenhuma imunidade celular (TIZARD, 2004). A seguir discorreremos sobre as principais vacinas inativadas que foram usadas contra brucelose bovina: 45/20, H-38 e PB.

5.2.1 Vacina 45/20

A persistência dos anticorpos séricos após a vacinação com a B19 impulsionou a busca por novas vacinas que solucionassem tal problema. Assim, o laborioso desafio do desenvolvimento de vacinas para controlar a brucelose, já praticado há anos, continuou. Passando às experimentações utilizando vacinas mortas que fossem capazes de conferir imunidade protetora, embora estas não tenham sido largamente utilizadas, pois os mais altos níveis de proteção eram obtidos quando os animais eram imunizados com vacinas vivas. Indicando que a persistência e a viabilidade da

vacina sejam aspectos-chave, necessários para uma vacina eficaz (FICHT et al., 2009).

A cepa lisa 45/20 de *B.abortus* foi isolada a partir de uma vaca em 1922 e após 20 passagens em cobaias obteve-se uma mutante rugosa, não aglutinogênica. Esta estirpe derivada foi testada em porquinhos da índia e em bovinos demonstrando sua capacidade de proteção à infecção por *Brucella* (MCEWEN; PRIESTLEY, 1938; MCEWEN, 1940). Inicialmente ela foi usada como uma vacina viva, mas seu uso foi descontinuado após ter se revertido para a forma lisa virulenta, durante a passagem no gado (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

A fim de superar a falta de estabilidade da estirpe viva 45/20, ela foi usada como uma bacterina incorporada em adjuvantes normalmente a base de óleo. Os resultados foram variáveis em relação a eficácia da proteção e também em relação a indução de sorologia positiva. A duração da imunidade conferida pela 45/20 não foi seguramente determinada e por essa razão uma revacinação anual era recomendada. A principal vantagem da 45/20 era que poderia ser usada seguramente em vacas em gestação. Entretanto, a necessidade de duas doses para obter proteção; além de que, no local da inoculação desenvolver acentuada inflamação que debilitava o animal e deixava significativa lesão na carcaça; e principalmente a indução de anticorpos aglutinantes após a vacinação, tais entraves levaram ao desuso da vacina 45/20 (ALTON, 1978).

5.2.2 Vacina H-38

Ainda digna de menção é a cepa lisa *B. melitensis* estirpe H-38, mortas em formoldeído e usadas em adjuvante de óleo mineral. Foi desenvolvida primariamente

para controle da brucelose em caprinos e ovinos Renoux et al.² (1964 apud SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002, p. 483). Mas ela mostrou ser também efetiva na imunização dos bovinos (ALTON, 1978). A H38 garantia uma boa protecção contra aborto, porém induzia sorologia positiva por tempo prolongado e reações inflamatórias no local da inoculação, tal como a vacina 45/20 (PLOMMET et al., 1970; MEYER; GIBBONS, 1978).

5.2.3 Vacina PB

Outra vacina foi a Pilet-Bonneau (PB), em que as células mortas de *Brucella* foram combinadas com anticorpos específicos para reduzir a reação aglutinogênica Pilet; Bonneau³ (1970 apud ALTON, 1978, p. 551). Embora a PB tivesse reduzida virulência, a imunidade protetora produzida por ela não foi satisfatória, assim, também não teve o seu uso continuado (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

As vacinas do tipo bacterinas, ou seja, usando frações antigénicas extraídas de *Brucella* foram vastamente utilizadas, em particular, associadas com uma variedade de adjuvantes. As quantidades de trabalhos semelhantes aos supracitados foram vastas, principalmente com animais de laboratório. Assim, diversas vacinas mortas foram testadas, mas a aceitação prática dessas bacterinas eram limitadas por muitas razões como custos de produção, baixa protecção, reações inflamatórias no local da injeção e reação de aglutinação sorológica que culminaram para o insucesso das vacinas mortas (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

² RENOUX, G.; NICHOLAS, J. A.; IMBERT, R.; QUECHON, M. Calf vaccination against *Brucella abortus*: comparison of four vaccines. **Bulletin of the Société Centrale de Médecine Vétérinaire**, v, 37, p. 139, 1964. Abstract 4381 in Veterinary Bulletin.

³ PILET, C.; BONNEAU, M. Sur un nouveau vaccin antibrucellique non agglutinogene (Vaccin P.B.). **Symposium Series Immunobiology Standard**, v 12, p. 53-62, 1970.

6 PERSPEQUITIVAS PARA O FUTURO DAS VACINAS

A história da vacinologia começou com a descoberta da vacina contra varíola, em 1796 por Edward Jenner. Desde então, o estudo das vacinas mantém-se até hoje, com técnicas inovadoras de biologia molecular e engenharia genética. A mais recente forma de imunização são as vacinas gênicas. É uma forma de imunização que se baseia na inoculação de moléculas de DNA plasmidial ou sequências gênicas de um patógeno em um indivíduo. Esse material genético é incorporado pelas células do hospedeiro e ativam linfócitos T citotóxicos e auxiliares e também linfócitos B, desencadeando assim, respectivamente, imunidade celular e humoral duradoura contra os microrganismos desejados (SHARMA; KHULLER, 2001). A seguir discorreremos alguns resultados, ainda em fase experimental, com possíveis aplicações das vacinas gênicas contra brucelose.

6.1 VACINAS GÊNICAS

Com o avanço da ciência e da tecnologia, houve a introdução de novas idéias e técnicas na vacinologia contra brucelose. Surgindo assim as vacinas de DNA, também chamadas de vacinas de nova geração na medicina veterinária, porém tais vacinas, ainda estão restritas ao uso em pesquisas (DHAMA et al., 2008).

A propriedade de transfecção de um DNA para células de mamíferos *in vivo* foi relatada pela primeira vez por Ito (1960). Mas só a partir da década de 90 começaram as pesquisas com vacinas baseadas em ácido nucleico. Entre os trabalhos precursores, destacam-se Wolff et al. (1990), que desenvolveram o

conceito de vacina gênica, através da inoculação DNA plasmidial recombinante em ratos para se obter a expressão do gene β -galactosidase (LIU, 2003).

A premissa básica das vacinas de DNA é: a presença de um gene que codifica um antígeno protetor de um agente patogénico, que, quando injetado no hospedeiro, é transcrito e traduzido, para induzir uma resposta imune específica, tanto humoral como celular. Assim, as vacinas recombinantes, funcionam como uma imunização genética capaz de estimular uma resposta imunitária protetora (SHARMA; KHULLER, 2001). Estas vacinas gênicas são úteis para o direcionamento *in vivo* da expressão de gene(s) de agentes patogénicos intracelulares como as brucelas, embora possam também ser utilizadas para a expressão de toxinas e antígenos protetores a partir de outros organismos (GURUNATHAN; KLINMAN; SEDER, 2000).

Em relação as vacinas contra brucelose, já existem vários estudos que utilizam a tecnologia de DNA ou proteína recombinante. Entre as pesquisas mais promissoras, estão os trabalhos com as proteínas ribossômicas *Brucella* L7/L12, a superóxido desmutase de cobre (SOD) e a glicosiltransferase, que estão relacionadas com a indução da proteção (SCHURING, 1999; RAJASEKARAN et al., 2011). No entanto, a maioria dos trabalhos ainda é em pequenos animais de laboratórios e/ou em condições experimentais. As vacinas de DNA mostraram algumas vantagens em camundongos isogênicos, por induzir uma resposta imune adequada, mas sem níveis significativos de proteção em comparação com as vacinas vivas atenuadas já existentes (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

Entre as vantagens das vacinas gênicas têm-se: a simplicidade de fabricação, relação custo benefício favorável, estabilidade biológica, a facilidade de transporte na forma liofilizada que dispensa a cadeia de frio e a capacidade de agir na presença de anticorpos maternos. Além disso, diferentes genes podem ser combinados simultaneamente, tornando possível o desenvolvimento de vacinas multivalentes (DHAMA et al., 2008). No entanto, o sucesso destas vacinas depende da selecção direta do antígeno, dos adjuvantes, e dos sistemas de entrega (CASSATARO et al., 2005). Ao aperfeiçoar estes factores, certamente essas vacinas estarão melhor adaptadas para uso nas fases avançadas dos testes clínicos.

Com esse objetivo, inúmeros componentes da superfície celular e intracelular foram avaliados como antígenos protetores contra infecção por brucelas. No entanto, poucos dos purificados têm significativamente atividade contra *B. abortus* (CASSATARO et al., 2005). Os pesquisadores estão buscando uma variedade de moduladores imune, como citocinas e moléculas co-estimulatórias, para almentar a resposta e a longevidade da resposta imunológica produzidas pelas vacinas de DNA. Considerando-se as tendências atuais e uma miríade de possibilidades, os esforços devem ser direcionados para a melhoria da transfecção e aumento do potencial imunogênico das vacinas de proteínas recombinantes e de DNA (DHAMA et al., 2008).

Por fim, deve ser lembrado que a resposta imunitária a antígenos individuais, incluindo os de *Brucella* spp., é governada pela base genética de um indivíduo. Portanto, alguns indivíduos podem ser protegidos pela imunização com um antígeno particular sob um formato de entrega em particular, enquanto outros podem não apresentar as mesmas características. Como no caso em que alguns indivíduos dentro de uma população são resistentes à brucelose, enquanto outros não são. O que pode ser atenuado para uma espécie de animal ou de indivíduos dentro dessa espécie, pode não ser para outras espécies ou indivíduos da mesma espécie (SCHURING; SRIRANGANATHAN; CORBEL, 2002).

6.2 VACINAS DE USO ORAL

Em vários casos a vacinação tem desempenhado um papel importante no controle das doenças infecciosas, reduzindo drasticamente a incidência ou até mesmo erradicando completamente. No entanto, o sucesso das estratégias de controle por vacinação, tem sido dificultada em casos onde uma ou mais espécies estão envolvidas na relação patógeno hospedeiro. Como na reintrodução da brucelose aos

rebanhos bovinos devido a presença dos reservatórios silvestres (STEVENS et al., 1996; TAHC, 2011).

Em alguns casos, a redução ou eliminação de uma doença nos reservatórios selvagens de vida livre é feito através do esterminio das espécies envolvidas. Toda via, existem limitações para o sacrifício, quer quando tal abordagem não é economicamente viável ou onde o impacto ecológico desse tipo de controle letal não seja aceito (AUBERT, 1999). Considerando as questões complexas relacionadas, a vacinação de espécies silvestres, torna-se uma alternativa viável ao esterminio em massa, e em muitos casos, pode representar a única ferramenta prática disponível para atingir o controle da doença (CROSS; BUDDLE; ALDWELL, 2007).

Os programas de vacinação anti-rábica oral em larga escala na Alemanha, França e Bélgica, utilizando o vírus vaccinia recombinante, conseguiu reduzir drasticamente a incidência da raiva nos reservatórios silvestre. Estimulando assim, a pesquisa de candidatas a vacina oral e outras vias de administração alternativas contra brucelose (PASTORET; BROCHIER, 1996).

Como as infecções por brucelas ocorrem principalmente através das superfícies mucosas, o desenvolvimento de vacinas administradas via mucosas pode ter um importante papel no controle da brucelose. Com esse pressuposto, uma vacina recombinante comestível contra a brucelose foi testada. Investigaram a resposta imune protetora desenvolvida contra infecção oral com *B. abortus* após a vacinação de camundongos com folhas de plantas transgênicas expressando U-Omp16 e U-Omp19; lipoproteínas externa de membrana de *B. abortus*. Ambas as candidatas a imunógeno, demonstraram potencial de indução da proteção contra *Brucella* quando administrado por via oral, sem a necessidade de adjuvantes (PASQUEVICH et al., 2009, 2010, 2011).

Cabe resaltar que para o sucesso de vacinas para animais selvagens de vida livre, inúmeros fatores são considerados importantes no seu desenvolvimento. Estes incluem: (1) uma versão segura e eficaz do imunógeno e que possa ser produzido em massa com baixo custo; (2) que o imunógeno seja altamente protetor e possa ser administrado por várias rotas, incluindo a via oral, tornando-o possível à entrega a campo; (3) o imunógeno seja resistente, estável e compatível com sistemas de

distribuição por isca. Tais princípios se estendem para outras doenças dos animais selvagens de vida livre. Contudo, nenhuma outra vacina de uso oral nos reservatórios silvestres, até agora, alcançou sucesso semelhante ao dos programas de vacinação contra raiva na América do Norte e norte da Europa (CROSS; BUDDLE; ALDWELL, 2007).

6.3 VACINA CONTRA BRUCELOSE HUMANA

A brucelose ainda é uma das doenças zoonóticas mais comuns em todo o mundo, com cerca de 500.000 casos humanos notificados anualmente, segundo a OIE (2008). As formas de infecção são múltiplas: de origem alimentar, ocupacionais ou recreativas, ligadas a viagens e até mesmo ao bioterrorismo (GODFROID, 2005). As *Brucella* sp. são os patógenos mais comuns adquiridos em laboratório. A distribuição geográfica da brucelose humana pode está em constante mudança, com os novos focos emergentes ou re-emergentes (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). Assim, novas brucelas podem emergir, ou espécies já existentes de brucelas se adaptarem a novos hospedeiros e nichos, devido a mudanças socioculturais como viagens e turismo. (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

A *Brucella melitensis* é relatado como o agente zoonóticos mais importante, seguido pela *Brucella abortus* e *Brucella suis*. No entanto esta afirmação parece ser baseada em evidências pouco fundamentadas ou apenas por compação de dados de literatura (ATLURI et al., 2011). Na Turquia, Dokuzoguz et al. (2005) compararam cinquenta e quatro pessoas com brucelose, sendo 83% infectados por *B. melitensis* e 17% por *B. abortus* e não encontraram diferença na gravidade do quadro clínico, onde febre e dores articulares foram os sintomas mais comuns para ambas as infecções, sendo que os pacientes do grupo infectado por *B. abortus* mencionaram sentir mais dores articulares e lombares.

O controle da brucelose animal através da vacinação e consequentemente a redução da exposição humana, limitou o desenvolvimento de vacinas contra brucelose para o homem (FICHT et al., 2009). Ainda assim, a erradicação na população animal, aconteceu apenas em um restrito número de países. Somado a isso, existe o potencial uso das brucellas em bioterrorismo ou guerras biológicas, sugerindo que as estratégias de prevenção direta sejam garantidas também à população humana (FICHT et al., 2009; IVANOV et al., 2011). Ainda porque, os custos dos tratamentos para brucelose é alto e o longo tempo desse tratamento, podem levar o paciente a desistir, reduzindo a eficácia da terapia (GODFROID, 2005).

Na antiga União Soviética e China, utilizavam vacinas vivas da cepa 19 e M-104 de *B. abortus*, respectivamente, para imunização em humanos (ACHA et al., 2001). Atualmente, não existe nenhuma vacina licenciada para brucelose em humanos. As vacinas disponíveis para os animais são predominantemente de cepas vivas atenuadas, e os efeitos colaterais associados à sua utilização, impedem o uso em humanos (OLIVEIRA; GIAMBARTOLOMEI; CASSATARO, 2011). Trabalhos com subunidades proteicas recombinantes de membrana externa de *B. abortus*, a fim de projetar uma vacina melhor para ser utilizada também em seres humanos, tem sido publicados nos últimos anos (PASQUEVICH et. al., 2010, 2011). Outros trabalhos com fins semelhantes têm procurado combinar as características ideais de uma vacina viva atenuada, no entanto que seja segura e eficaz aos humanos, através do melhoramento do sistema de entrega do antígeno que seria por microencapsulação, esses imunógenos, em questão, seriam de administração por via oral ou intranasal (FICHT et al., 2009).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- As vacinas recomendadas para uso em rebanhos bovinos são as vacinas vivas atenuadas B19 e RB51, pois têm demonstrado ser seguras e estáveis, além de estimular imunidade celular duradoura contra *Brucella abortus*;
- Não existe uma vacina contra brucelose que atenda ao conceito de vacina ideal;
- Devem ser continuados os esforços para o desenvolvimento de um imunógeno que proteja de todas as espécies de brucelas patogênicas, que seja de baixo custo, eficaz e segura para uso em animais e humanos;
- Devem ser realizados estudos para avaliar o “clearance” vacinal da RB51, e assim avaliar o risco dessa eliminação no leite;
- É recomendável o desenvolvimento e padronização de uma técnica de diagnóstico indireta para identificar animais vacinados com a RB51;
- É importante o desenvolvimento de uma vacina contra brucelose para uso em reservatórios silvestres de vida livre, visando diminuir o risco de reintrodução da doença nos rebanhos comerciais;

- As vacinas de base molecular parecem ter um futuro promissor, pois relatam a possibilidade de serem multivalentes, liofilizáveis, baixo custo, indutoras de imunidade celular e humoral, possíveis de serem usadas em animais e humanos, embora ainda em fase experimental de estudo pré-clínico.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Brucelosis. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p.14-35.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. 416 p.

ADONE, R.; FRANCA, M.; CIUCHINI, F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. **Vaccine**, v. 26, p. 4913-4917, 2008.

ADONE, R.; CIUCHINI, F.; OLSEN, S. Field validation of the use of RB51 as antigen in a complement fixation test to identify calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 385-387, 2001.

ALMEIDA, G. L. G.; D'ALMEIDA, J. M.; HORN, S. C. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. Boletim de Defesa Sanitária Animal, p. 101, 1988. N. especial.

ALTON, G. G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 551-557, 1978.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; PIETZ, D. E. **Laboratory techniques in brucellosis**. 1975. 80 f. Technical Monograph. Series n. 55. World Health Organisation, Geneva, 1975.

ALVES, V. C. P.; GONÇALVES, V. C. F.; FIGUEREDO, J. R.; BAHIANSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 06-13, 2009.

AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Modelagem matemática do controle de brucelose bovina por vacinação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 135-141, 2009.

ARELLANO-REYNOSO, B.; DÍAZ-APARICIO, E.; LEAL-HERNÁNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, L.; GORVEL, J. P. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 307–312, 2004.

ASHFORD, D. A.; PIETRA, J.; LINGAPPA, J.; WOODS, C.; NOLL, H.; NEVILLE, B.; WEYANT, R.; BRAGG, S. L.; SPIEGEL, R. A.; TAPPERO, J.; PERKINS, B. A. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. **Vaccine**, v. 22, p. 3435-3439, 2004.

ATLURI, V. L.; XAVIER, M. N.; JONG, M. F. de; HARTIGH, A. B. den.; TSOLIS, R. M. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 523-541, 2011.

AUBERT, M.F. Costs and benefits of rabies control in wildlife in France. **Revue Scientifique et Technique**, v. 18, p. 533-543, 1999.

AZEVEDO, S. S.; FERREIRA, NETO J. S.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SOUZA, A. C.; VASCONCELLOS, S. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 19-26, 2009.

BARDENSTEIN, S.; MANDELBOIM, M.; FICHT, T. A.; BAUM, M.; BANAI, M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans

in Israel by PCR analysis of the *Pst*I site polymorphism of its *omp2* gene. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1475–1480, 2002.

BLASCO, J. M. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, p. 275-283, 1997.

BLASCO, J. M.; MARIN, C. M.; BARBERAN, M.; MORIYON, I.; DIAZ, R. Immunization with *Brucella melitensis* Rev.1 against *Brucella ovis* infection of rams. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 381-392, 1987.

BLASCO, J. M.; GAMAZO, C.; WINTER, A. J.; JIMENEZ, de B. M.P.; MAN, C.; BARBERAN, M.; MORIYON, I.; ALONSO-URMENETA, B.; DIAZ, R. Evaluation of whole cell and sub-cellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 37, p. 257-270, 1993.

BOSSERAY, N.; PLOMMET, M. *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Ver.1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. **Vaccine**, v. 8, p. 462-468, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diagnóstico de saúde animal**. Brasília. 1977, 735 p.

BRAZIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº02 de 10 janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jun 2001. Seção 1, p. 26-31.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº33 de 24 de agosto de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 ago. 2007. Sec. 1, pt.6.

BUDDLE, M. B. Studies on *Brucella ovis* n. sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal of Hygiene**, v. 54, p. 351-364, 1956.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **Journal of Infection**, v. 45, n. 2, p. 122-127, 2002.

CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. Brucelose Alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, v. 2, n. 4, p. 259-261, 1995.

CASSATARO, J.; ESTEIN, S. M.; PASQUEVICH, K. A.; VELIKOVSKY, C. A.; BARRERA, S. de la; Bowden, R.; Fossati, C. A.; Giambartolomei, G. H. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-Amino-Acid synthetic peptide elicits a CD4⁺ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8079-8088, 2005.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Brucellosis: RB51 Exposures**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/brucellosis/rb51.html>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 46-55, 2009.

CROSS, M. L.; BUDDLE, B. M.; ALDWELL, F. E. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 472-480, 2007.

CURTA, J. C.; SIMÃO, R. C. G.; SEGER, J. Vacina de DNA contra doenças infecciosas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p. 187-191, 2008.

DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; GUPTA, P. K.; RAI, A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 341-356, 2008.

DIAS, J. A.; MÜLLER, E. E.; DIAS, R. A.; FREITAS, J. C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, M. C. P.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 66-76, 2009a.

DIAS, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; LIMA, Z. M. B.; PAULIN, L. M. S.; GUNNEWIEK, M. F. K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 118-125, 2009b.

DIJKHUIZEN, A. A.; HUIRNE, R. B. M.; JALVENGH, A. W. Economic analysis of animal diseases and their control. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 25, p. 135-149, 1995.

DIKUZOGUZ, B.; ERGONUL, O.; BAYKAM, N.; ESENER, H.; KILIC, S.; CELIKBAS, A.; EREN, S.; ESEN, B. Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. **Journal of Infection**, v. 50, p. 41-45, 2005.

ELBERG, S. S.; FAUNCE, W. K. Immunization against *Brucella* infection. IV. Immunity conferred on goats by a non-dependant mutant from a streptomycin dependant mutant strain of *Brucella melitensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 211-217, 1957.

ERASMUS, J. A.; BERGH, E. C. Ovine brucellosis: repeated vaccination with Rev.1 vaccine and the prevalence of the disease in the Winburg district. **Journal South African Veterinary Medical Association**, v. 56, p. 205-208, 1985.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).

FARIA, J. F. Situação da brucelose no Brasil. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 161-175, 1984.

FENSTERBANK, R.; PARDON, P.; MARLY, J. Efficacy of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 13, p. 185-190, 1982.

FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; TELLES, E. O.; LOBO, J. R.; FIGUEREDO, V. C. F.; FERREIRA, F. Epidemiological situation of brucellosis in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VETERINARY EPIDEMIOLOGY AND ECONOMICS, 13., 2012. Maastricht, Netherlands, Belgium. Abstracts... Netherlands: Wageningen Academic Publishers: 2012. p. 1.

FICHT, T. A.; KAHL-MCDONAGH, M. M.; ARENAS-GAMBOA, A. M.; RICE-FICHT, A. C. Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines. **Vaccine**, v. 27, p. D40-D43, 2009.

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

GARCIA-CARRILLO, C. Comparison of *Brucella melitensis* Rev.1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. **Zentralbl Veterinaermedizin**, 27, 131-138, 1980.

GARCIA-CARRILHO, C. **La brucellosis de los animales em América y su relación com la infección humana**. Paris: Office International des Épizooties, 1987. 299p.

GARIN-BASTUJI, B.; BLASCO, J. M.; VERGER, J. M. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. **Veterinary Research**, v. 29, p. 255-274, 1998.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J. P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J. J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v. 36, p. 313-326, 2005.

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

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. B.; ALVES, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 35-45, 2009b.

GONÇALVES, V. S. P.; RIBEIRO, L. A.; CALDAS, R. A.; FRANCISCO, P. F. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BORGES, J. R. J. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 14-18, 2009a.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Annual Reviews in Immunology**, v. 18, p. 927–974, 2000.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2003. 443 p.

HOFFER, E.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; DAHOUK, S. A.; RIEHM, J. M.; NOCKLER, K.; ZYGMUNT, M. S.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. **Veterinary Microbiology**, v. 155, p. 93-99, 2012. Short communication.

HORWELL, F. D.; VAN DRIMMELEN, G. G. *Brucella melitensis* strain Rev.1 as a vaccine in cattle. **Journal South African Veterinary Medical Association**, v. 42, p. 233-235, 1971.

ITO, Y. A tumor reducing factor extracted by phenol from papillomatous tissue of cotton tail rabbits. **Virology**, v. 12, p. 596-601, 1960.

IVANOV, A. V.; SALMAKOV, K. M.; OLSEN, S. C.; PLUMB, G. E. A live vaccine from *Brucella abortus* strain 82 for control of cattle brucellosis in the Russian Federation. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 113-121, 2011.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GITTI, C. B.; PEREIRA, L. A.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 77-84, 2009.

LAGE, A. P.; ROXO, E.; MÜLLER, E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. P. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2006. 184 p. Manual Técnico.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 32, p. 202-212, 2008.

LEAL-HERNANDEZ, M.; DÍAZ-APARICIO, E.; PÉREZ, R.; HERNÁNDEZ ANDRADE, L.; ARELLANO-REYNOSO, B.; ALFONSECA, E.; SUÁREZ-GÜEMES, F. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active Brucellosis, with presence of atypical humoral response. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 63-70, 2005.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**, v. 253, p. 402-410, 2003.

LUNA-MARTINEZ, J. E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: Current status and trends. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 19-30, 2002.

MARVULO, M. F. V.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GROFF, A. C. M.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 93-102, 2009.

MANTUR, B. G.; AMARNATH, S. K.; SHINDE, R. S. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007.

MCEWEN, A.D. Experiments on contagious abortion. The immunity of cattle inoculated with vaccines of graded virulence. **Veterinary Research**, v. 52, p. 815-821, 1940.

MCEWEN, A. D.; PRIESTLEY, F. W. Experiments on contagious abortion. Immunization studies with vaccines of graded virulence. **Veterinary Research**, v. 50, p. 1097-2011, 1938.

MEYER, K. F.; SHAW, E. B. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. I. **Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 173-184, 1920.

MEYER, M. E.; GIBBONS, R. W. Results of trial use of H-38 vaccine for immunizing beef heifers against experimental exposure to *Brucella abortus*, strain 2308. In: ANNUAL MEETING OF US ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 82., 1978, New York. **Proceedings of the...** New York: USAHA, 1978. P. 106-119.

NEGREIROS, R. L.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 56-65, 2009.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Veterinary microbiology**, v. 90, p. 5-9, 2002.

OGATA, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; RODRIGUES, A. L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 126-134, 2009.

OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V. A. Vacinas de DNA e biosegurança. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 18, p. 46-48, 2001.

OLIVEIRA, S. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; CASSATARO, J. Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1291-1305, 2011.

OIE. ORGANIZATION INTERNATIONAL EPIZOOTIES. **Terrestrial Animal Health**, 2008. Chap. 2.4.3. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03.%20Brucellosis%20bovina.pdf >. Acesso em: 20 set. 2011.

PALMER, M. V.; OLSEN, S. C.; GILSDORF, M. J.; PHILO, L. M.; CLARKE, P. R.; CHEVILLE, N. F. Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 11, p. 1604-1607, 1996.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P. Challenges in *Brucella* bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, p. 29-31, 2007. Supplement.

PASQUEVICH, K. A.; ESTEIN, S. M.; GARCIA SAMARTINO, C.; ZWERDLING, A.; CORIA, L. M.; BARRIONUEVO, P.; FOSSATI, C. A.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; CASSATARO J. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 436-445, 2009.

PASQUEVICH, K. A.; GARCIA SAMARTINO, C.; CORIA, L. M.; ESTEIN, S. M.; ZWERDLING, A.; IBÁÑEZ, A. E.; BARRIONUEVO, P.; OLIVEIRA, F. S. de.; CARVALHO, N. B.; BORKOWSKI, J.; OLIVEIRA, S. C.; WARZECHA, H.;

GIAMBARTOLOMEI, G. H.; CASSATARO, J. The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 5200-5212, 2010.

PASQUEVICH, K. A.; IBAÑEZ, A. E.; CORIA, L. M.; GARCIA SAMARTINO, C.; ESTEIN, S. M.; ZWERDLING, A.; BARRIONUEVO, P.; OLIVEIRA, F. S.; SEITHER, C.; WARZECHA, H.; OLIVEIRA, S. C.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; CASSATARO, J. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *Brucella abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. 16203, 2011.

PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 235-240, 1996.

PAULIN, L. M. Brucelose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 239-249, 2003.

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

PICKLES, T. **Malta 1565: last battle of crusades**. New Orleans: Osprey Publishing, 1998. 96 p.

PLOMMET, M.; RENOUX, G.; PHILPPON, A.; LORENTZ, C.; GESTIN, J. Brucellose experimentale. Comparison de l'efficacité des vaccins B19 and H38 vaccine. **Annales Recherches Vétérinaires**, v. 1, p. 189-201, 1970.

POESTER, F. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de

Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 1-5, 2009.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.

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

RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS): Brucellosis eradication program in the United States. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 11-18, 2002.

RAJASEKARAN, P.; SURENDRAN, N.; SELEEM, M. N.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G. G.; BOYLE, S. M. Over-expression of homologous antigens in a leucine auxotroph of *Brucella abortus* strain RB51 protects mice against a virulent *B. suis* challenge. **Vaccine**, v. 29, p. 3106-3110, 2011. Short communication.

ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L.; BRITO, W. M. E. D.; DIAS, R. A.; DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 27-34, 2009.

SAMARTINO, L. E.; FORT, M.; GREGORET, R.; SCHURIG, G. G. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhood vaccination with strain 19 in Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p. 193-199, 2000.

SCHOLZ, H. C.; NOCKLER, K.; GOLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S. A.; KAMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; KUMAR, B. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 801-808, 2010.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLACEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; DAHOUK, S. A.; MELZER, F.; KAMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GOLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NOCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 375-382, 2008.

SCHURING, G. Necesidades de investigacion: unos cuantos enfoques. In: CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (OPS/OMS). **Brucelosis consulta de expertos de La OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunacion**. Santiago, Chile: OPS/OMS, 1999. p. 125-126. Informe final. Trabalho apresentado na Reunião de Consulta de Expertos de la OPS/OMS sobre Vacunas y Estratégias de Vacunacion en los Programas de Control y Erradicación de la Brucelosis. Tradução de Narey Cotrina; Rosane Hansen R. Lópes; Maria da Penha M. Silva.

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

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

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 392-398, 2010.

SHARMA, A. K.; KHULLER, G. K. DNA vaccines: future strategies and relevance to intracellular pathogens. **Immunology and Cell Biology**, v. 79, p. 537-546, 2001.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p.103-108, 2009.

SILVA, V. G. S. O.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E. L. S.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p.109-117, 2009.

STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C.; CHEVILLE, N. F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, p. 223-235, 1995.

STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C.; PALMER, M. V.; PUGH JR., G. W. Immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 4534-4541, 1996.

TIZARD, I.R. Veterinary Immunology. An introduction. 7. Ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 494 p.

TAHC. TEXAS ANIMAL HEALTH COMMISSION. **Cattle brucellosis found in herd in starr county. Local Producers Urged to Comply with TAHC Regulations.** Austin, Texas: Texas Comissão de Saúde Animal, 2011. Disponível em: http://www.tahc.state.tx.us/news/pr/2011/2011Feb_BrucellosisInStarrCounty.pdf. Acesso em: 20 nov. 2011.

UZAL, F. A.; SAMARTINO, L.; SCHURIG, G.; CARRASCO, A.; NIELSEN, K.; CABRERA, R. F.; TADDEO, H. R. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. **Veterinary Research Communications**, v. 24, p. 143-151, 2000.

VASSALLO, D. J. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army medical Corps. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v. 138, n. 3, p. 148-150, 1992.

VEMULAPALLI, R.; HE, Y.; BUCCOLO, L. S.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N.; SCHURIG, G. G. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in o-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3927-3932, 2000.

VERGER, J. M.; GRAYON, M.; ZUNDEL, E.; LECHOPIER, P.; OLIVIER-BERNARDIN, V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. **Vaccine**, v. 13, n. 2, p. 191-196, 1995.

VILLAR, K. S.; AMAKU, M.; DIAS R. A.; FERREIRA, NETO J. S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p.85-92, 2009.

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, p. 1465-1468, 1990.

WYATT, H. V. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. **Journal of the Royal Society of medicine**, v. 98, p. 451-454, 2005.

XIE, X. Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2. **Vaccine**, v. 4, p. 212-216, 1986.