WANESSA DE ANDRADE PACHECO

“Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo”

São Paulo
2007

WANEISSA DE ANDRADE PACHECO

“Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo”

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses

Orientador:

Margareth Elide Genovez

São Paulo
2007

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

81
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
26/4/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1851
FMVZ

Pacheco, Wanessa de Andrade

Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo / Wanessa de Andrade Pacheco. – São Paulo : W. A. Pacheco, 2007.

69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicadas as Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Margareth Elide Genovez.

1. Brucelose. 2. Vacina B19. 3. Ciclo reprodutivo. 4. Reação em cadeia por polimerase. 5. Bovinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da eliminação da *Brucella abortus*, estirpe B19 no leite, sangue e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose", protocolo nº502/2004, utilizando 40 (quarenta) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Margareth Elide Genovez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of *Brucella abortus*, strain B19 elimination in milk, blood and urine of female bovine of different ages vaccinated against brucellosis", protocol number 502/2004, utilizing 40 (forty) bovines, under the responsibility of Profa. Dra. Margareth Elide Genovez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 25 de abril de 2007

Prof. Dr. Jose Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PACHECO, Wanessa de Andrade

Título: **Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo**

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

Data: 22/08/10

Banca Examinadora

Prof. Dr. MARCELO CLIDE GONCALVES Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Liliana M. Paulin Silveira Instituição: Instituto Biológico-APTA-SAA

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. José S. F. M. V. Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADO

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais,
por me apoiarem sempre, em todos os
momentos da minha vida e as minhas
irmãs pelo incentivo, companheirismo e
torcida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e **Nossa Senhora**, por me guiarem durante esta jornada, clareando minhas idéias e me dando força para seguir em frente.

A todos os meus mestres.

Especialmente à minha orientadora Dra **Margareth** Elide Genovez, pela dedicação, colaboração, apoio, disposição e amizade.

Ao Prof. Dr. **Silvio** A. Vasconcellos, pela colaboração, apoio e amizade; por seus exemplos de tranquilidade, simplicidade, disciplina e equilíbrio, incentivando sempre.

À Dra. Claudia Pozzi (e toda sua equipe), por permitir que este estudo fosse realizado em seu rebanho experimental.

À Profa. Dra. **Maria** Lúcia Gamberine, pela colaboração e apoio, não medindo esforços para transmitir seus conhecimentos na área de reprodução animal, sendo de fundamental importância para realização das dosagens hormonais.

A todos colegas do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico.

Especialmente a Dra. **Lília** Márcia Paulin, pela colaboração, apoio, incentivo, disponibilidade e amizade; por seus exemplos de profissionalismo, garra e determinação; por me apresentar e me inserir no mundo das "brucelas", grande parte dos meus conhecimentos se deve a sua dedicação, entusiasmo e didática. Obrigada também pela confiança e companheirismo dentro e fora do ambiente de trabalho.

A Dra. **Eliana** Scarcelli e Dra. **Simone** Miyashiro pelos ensinamentos sobre biologia molecular.

Às figurinhas mais queridas do laboratório: **Antera** e **Mariazinha**. Vocês valem ouro!

Aos amigos, **Fabíola**, **Geraldo**, **Maíra** e **Marina**, por não me deixarem desistir quando tudo parecia não dar certo; e claro, pelos vários momentos de descontração que passamos juntos. Adoro vocês!

A **Carol** Campello, por todo apoio dado no laboratório pelos longos papos fora de hora, pelas gargalhadas e companhia dentro e fora do laboratório.

A **Carol** (Paraíba), **Jéssica**, **Vanessa**, **Solange** e **Tatiana**, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos grandes colaboradores

Ao Prof. Dr. **Sérgio** Santos de Azevedo, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), por todo apoio dado na área estatística deste trabalho.

A Dra **Lara** Borges Keid, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por ceder a cepa de *Brucella abortus* ATCC 544 utilizada na PCR.

A todos da Fazenda Palmeira do Instituto de Zootecnia -Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócio - APTA

A Dra. **Cristina** Dib por me ajudar durante as colheitas das amostras.

Ao **Jacaré** e toda a equipe de **funcionários** da Fazenda pela colaboração e apoio durante todo o período que passei em Nova Odessa.

Á grande amiga/irmã

Daniela Pereira não só por me abrigar em sua casa durante a fase experimental á campo deste trabalho; mas por tudo, nossa amizade é para vida toda.

Aos animais

Por servirem de instrumento para meu aprendizado.

As Instituições as quais tive o privilégio de freqüentar

À **Faculdade de Medicina Veterinária José Rosário Velano – UNIFENAS**, onde me graduei em novembro de 2001.

Ao **Instituto Biológico**, onde ingressei como estagiária em fevereiro de 2002, e permaneço até os dias de hoje trabalhando no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução – Brucelose.

Ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS)**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo (USP), onde ingressei em julho de 2004.

Ao **Instituto de Zootecnia** – Fazenda Palmeira, onde realizei a parte experimental a campo deste trabalho de junho de 2005 a dezembro de 2006.

Ao auxílio financeiro

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

RESUMO

PACHECO, W. A. **Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo.** [Excretion of *Brucella abortus*, B19 strain in milk and urine samples from female bovine of several ages, vaccinated against brucellosis and your relation with reproductive cycle]. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) proposto pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) adotou como medida central à vacinação com a B19 de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, entre três e oito meses de idade. Embora a B19 seja capaz de conferir 65 a 70 % de proteção contra a maioria dos níveis de exposição de fêmeas bovinas, se utilizada na dose correta e na idade recomendada, o período de excreção e seu efeito sobre animais comunicantes e suscetíveis, incluindo o homem ainda são pouco conhecidos e por se tratar de uma vacina viva e virulenta deve-se atentar para o papel zoonótico no manejo dos animais excretadores. O presente estudo avaliou a excreção da estirpe B19 pelo leite e urina, de 14 fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias, que foram imunizadas dos três aos oito meses de idade, provenientes de um rebanho de exploração leiteira, empregando-se o diagnóstico bacteriológico e PCR, correlacionando-os com as fases hormonais de um ciclo reprodutivo completo. Todas as amostras positivas na PCR para *Brucella* spp. foram confirmadas como sendo da estirpe vacinal B19, sendo sua excreção predominantemente no momento do cio aos 150 dias de gestação e no pós-parto imediato (30 dias), ou seja, independentemente da fase hormonal. A persistência e excreção de B19 foi observada em fêmeas bovinas de até nove anos de idade.

Palavras-chave: Brucelose. Vacina B19. Ciclo reprodutivo. Reação em cadeia por polimerase. Bovinos

ABSTRACT

PACHECO, W. A. "Excretion of *Brucella abortus*, B19 strain in milk and urine samples from female bovine of several ages, vaccinated against brucellosis and your relation with reproductive cycle". [Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo]. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The National Program of Brucellosis and Tuberculosis Control and Eradication (PNCEBT) designed by MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) adapted as the central of vaccination by law with B19 the of all females of bovine and bubaline species, between three and eight months of age. However the B19 should be capable of verifying 65 – 70% of protection against a large number of levels of exposition of bovines if utilized in the correct dose and age recommended the period of excretion and your effect about communicant animals and bound to included men but are still not well known and for the subject of biovaccines of a high infectious should be watchful for the role of zoonotic in the handling of animals that's eliminate these vaccines. This studies evaluated the excretion of B19 strain in milk and urine of 14 bovine females the different ages that was immunized at three and eight months of age originated from heads of milky exploration, based on the bacteriologic tests and polymerize chain reaction (PCR) diagnoses correlated with hormonal fases of complete reproductive cycle. All of positive samples in PCR for *Brucella* spp. was confirmed for B19 strain being its excretion predominantly at moment of cio about 150 pregnant days and the pos parturition (30 days) or else independently the hormonal fase. The persistence and excretion of B19 was observed in bovine females until nine years old.

Key words: Brucellosis. Vaccine B19. Reproductive cycle. Polymerize chain reaction. Bovines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sala de ordenha-----	29
Figura 2 -	Sistema de semiconfinamento, animais a pasto e estabulados-----	30
Figura 3 -	Piquetes das novilhas de reposição-----	31
FIGURA 4 -	Teste de ELISA C com os kits comerciais de ELISA para estrógeno e progesterona.-----	38
FIGURA 5 -	Aplicação da técnica de PCR com os “primers” B ₄ e B ₅ (BAILY ET AL., 1992) aplicada às amostras de urina, utilizando extração de DNA por fervura – São Paulo – 2007.-----	47
FIGURA 6 -	Aplicação da técnica de PCR com os “primers” B ₄ e B ₅ (BAILY ET AL., 1992) aplicada às amostras de leite, utilizando extração de DNA por DNAzol – São Paulo – 2007.-----	47
FIGURA 7 -	Aplicação da técnica de PCR com os “primers” ery 1 e ery 2 (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada às amostras de urina, utilizando extração de DNA por fervura – São Paulo – 2007.-----	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Exames laboratoriais para brucelose aplicados às amostras de sangue, urina e leite de três grupos de fêmeas bovinas segundo a faixa etária e as dosagens hormonais durante as fases de um ciclo reprodutivo completo. São Paulo, 2007.----- 41
- Tabela 2 - Proporção de fêmeas bovinas segundo a faixa etária, excretoras de *Brucella abortus* estirpe B19 pela urina, detectada pela PCR, segundo as fases de um ciclo reprodutivo completo. São Paulo, 2007.----- 46
- Tabela 3 - Proporção de fêmeas bovinas segundo a faixa etária, excretoras de *Brucella abortus* estirpe B19 pela urina e pelo leite, detectada pela PCR. São Paulo, 2007.----- 46
- Tabela 4 - Dosagens hormonais (mediana) de três grupos de fêmeas bovinas segundo a faixa etária durante as fases de um ciclo reprodutivo completo. São Paulo, 2007.----- 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Períodos de colheitas de amostras de sangue, urina e leite de fêmeas bovinas segundo as fases de um ciclo reprodutivo completo. São Paulo, 2007.-----	34
Quadro 2-	Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção de <i>Brucella</i> spp.-----	36
Quadro 3-	Seqüência dos “primers” utilizados para a diferenciação da origem da cepa de <i>Brucella abortus</i> em campo ou vacinal (B19).-----	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

α	Alfa – primeira letra do alfabeto grego
β	Beta – segunda letra do alfabeto grego
%	por cento
μ g	Microgramas
AAT	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado
APTA	Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
ATP	Adenosina Tri – Fosfato
BVD	Diarréia Viral Bovina
°C	graus Celsius
CCS	Contagem de Células Somáticas
cm	Centímetro
DH	Dosagem Hormonal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA C	Teste imunoenzimático ELISA competitivo
<i>et al.</i>	e colaboradores
E17 β	Estradiol-17 β
FC	Teste da Fixação do Complemento
fg	Fentograma
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Horas
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
L	Litro
LH	Hormônio Luteinizante

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ME	Teste do 2-Mercaptoetanol
mL	Mililitros
mM	Micrômetro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OIE	World Organization for Animal Health
P4	Progesterona
pb	Pares de base
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
SLT	Teste da Soroaglutinação Lenta em Tubos
SAR	SAR ----- Teste de Soroaglutinação Rápida em placa
TAL	Teste do Anel em Leite
TBE	Tris-Borato EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UI	Unidade Internacional
V	Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Delineamento Experimental	28
3.1.1	Rebanho Experimental	28
3.1.2	Formação dos grupos de animais	32
3.1.3	Colheita das amostras clínicas	33
3.2	Testes Sorológicos para Diagnóstico da Brucelose Bovina	35
3.3	Cultivo Microbiológico para Isolamento de <i>Brucella spp.</i>	35
3.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Multiplex PCR – <i>Brucella abortus</i> e <i>Brucella abortus</i> B19	35
3.4.1	Extração de DNA das amostras de leite e urina	35
3.4.2	Reação de PCR para <i>Brucella spp</i>	36
3.4.3	Multiplex PCR para detecção de <i>Brucella abortus</i> e diferenciação da cepa, em vacinal ou campo	37
3.5	Dosagens Hormonais	37
3.6	Tratamento estatístico	38
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma antroponose de curso predominantemente crônico provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella* spp. coco bacilo pleomórfico pequeno, aflagelado, não formador de esporos e que se cora facilmente pelo método de Ziehl-Neelsen e Koster modificados (ALTON et al., 1975; TIMONEY et al., 1988). Esta bactéria caracteriza-se por infectar células do sistema mononuclear fagocitário. Nos animais, compromete especialmente o sistema reprodutivo e ósteo-articular e ocasiona com frequência o abortamento no terço final da gestação, sem provocar outro sintoma aparente (PAULIN, 2006b).

No Brasil, ocorre em todos os Estados, afetando principalmente bovinos e suínos, sendo também um dos mais sérios problemas sanitários em bubalinocultura. Além destas espécies, tem sido relatada em caprinos, ovinos, eqüinos e cães (GARCIA - CARRILLO, 1990).

A brucela tem grande capacidade de sobrevivência se comparada a outras bactérias patogênicas não esporuladas, principalmente em ambiente úmido contendo matéria orgânica, ao abrigo da luz solar direta e pH neutro (OMS, 1986). No solo, com luz solar direta, o tempo de sobrevivência da bactéria é de cerca de quatro horas, porém à sombra este tempo pode ser dilatado até sete meses. Nos exudatos uterinos pode sobreviver até 200 dias ou mais e no feto abortado até oito meses dependendo das condições ambientais. Na urina de bovinos sobrevive até quatro dias. Já no leite pasteurizado ou fervido ocorre morte imediata da bactéria. Entretanto se mantida a 15 °C sobrevive até 38 dias (PAULIN, 2000). Em geral a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento, a secagem de ambientes úmidos e o vazio sanitário de no mínimo dois meses são suficientes para evitar a transmissão (USDA, 2006).

Antigenicamente, as brucelas são divididas em dois grupos distintos: as lisas ou clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e as rugosas ou não clássicas (*B. ovis*, *B. canis* e *B. maris*). *B. abortus* subdivide-se em oito biotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3) e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). As rugosas, apesar de apresentarem variantes, não se subdividem em biotipos (METCALF, et al., 1994; QUINN, et al., 1996; CORBEL, 1997). Cada espécie

de brucela pode infectar muitas espécies animais, embora demonstre preferência por determinado hospedeiro (VIZCAÍNO et al., 2000).

O principal agente para bovinos é a *B. abortus* biotipo 1 presente no mundo todo (ACHA; SZYFRES, 1986; CORBEL, 1997). No Brasil, até 1985, foram confirmados os biotipos 1, 2 e 3 (GARCIA – CARRILLO, 1990).

Até o momento foram relacionados à infecção humana as espécies *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis* em ordem decrescente de patogenicidade, sendo a *B. abortus* a mais freqüente causadora da infecção humana no mundo (ACHA; SZYFRES, 1986). Os sinais mais comuns de brucelose no homem são aqueles observados nos quadros de infecção generalizada aguda: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios e sudorese noturna profusa de odor característico, fadiga, insônia, cefaléia, artralgia entre outros (ACHA; SZYFRES, 1986; CARTER; CHENEGAPPA, 1991). O curso tende a cronicidade e são freqüentes as recidivas de intensidade variada. Na maioria dos casos a recuperação ocorre em um a dois anos com ou sem tratamento (PAULIN, 2006b).

As brucelas ingressam no hospedeiro pelas mucosas dos tratos digestivo, genital, respiratório e mucosas conjuntivas ou então por soluções de continuidade da pele, sendo que os bovinos se infectam principalmente pelas mucosas orofaríngeas (BISHOP et al., 1994). Então são carregadas até os linfonodos e fagocitadas principalmente por macrófagos, onde podem permanecer queiscentes por meses (BEER, 1988; BISHOP et al., 1994). Através da corrente circulatória chegam aos órgãos de predileção (baço, fígado, linfonodos), ou seja, naqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para o seu metabolismo. Nos bovídeos, destacam-se produtos da degradação dos hormônios esteróides, a Prostaglandina F2 α (PGF2 α) e o Estradiol-17 β (E17 β), além de outras progestinas (QUINN et al., 1994). Acredita-se que os produtos da degradação desses hormônios sejam talvez utilizados no metabolismo das brucelas, que colonizam e multiplicam-se dentro dos trofoblastos (SMITH et al., 1961; MEADOR; DEYOE, 1989). A replicação intracelular massiva culmina no rompimento do trofoblasto infectado, permitindo que a bactéria acesse diretamente o feto (PAYNE, 1959). Outro metabólito que merece destaque é o eritritol, presente no útero gravídico, tecidos mamários e ósteo-articulares e órgãos do sistema reprodutivo masculino: testículos, epidídimo e vesícula seminal (OMS, 1986; CARTER; CHENEGAPPA, 1991). A oferta do eritritol cresce na razão direta da

evolução da gestação, porém apresenta alta concentração chegando ao máximo aos cinco meses de gestação (SAMARTINO et al., 1996).

A multiplicação da *Brucella abortus* no ambiente uterino desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas que evolui para necrose, lise das vilosidades e subsequente deslocamento do cotilédone e da carúncula. Nos cursos agudos, esse processo desencadeia o abortamento. Porém quanto menos intensa for a necrose, maior será a deposição de fibrina entre as vilosidades e mais tardio o abortamento, podendo a gestação vir a termo, gerando produtos que sobrevivem poucos dias. Excesso de deposição de fibrina leva à retenção de placenta. As lesões também diminuem a circulação materna fetal, comprometendo a respiração e a alimentação do produto, levando-o a morte, que também pode ser causada pelas próprias bactérias, caso estejam em concentração elevada no âmnion. O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônicas, gerando subfertilidade, infertilidade ou esterelidade, em geral apresentando secreção vaginal (PAULIN, 2006b). Cerca de duas semanas após a expulsão do produto, quando o útero entra em repouso e a bactéria migra para outros órgãos ativos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, pode ocorrer mastite crônica sem lesões aparentes ou mudanças das características do leite (BATHEKE, 1988).

A bactéria é eliminada em grandes quantidades pelo animal infectado pelos produtos do abortamento ou parto e pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos e suscetíveis. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e persiste por meses (ACHA; SZYFRES, 2001).

Numa infecção aguda de brucelose é esperado que as brucelas, distribuídas via hematogênica, estejam presentes em todos os órgãos das fêmeas (GALLIEN et al., 1998). Em bovinos não há imunidade transferida da mãe para o feto através da placenta, mas pelo colostro após o nascimento, sendo que as moléculas intactas de imunoglobulinas são absorvidas pela parede do trato gastrointestinal dos ruminantes apenas até as primeiras 36 horas de vida (PAULIN, 2000).

Quando a brucela é introduzida em uma população suscetível, num primeiro momento a maioria das fêmeas infectadas aborta (ACHA; SZYFRES, 2001). Na prenhez subsequente, há reinvasão do útero, mas a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente o sinal ocorre na terceira prenhez. Passada a fase aguda sobrevém à crônica, quando apenas os animais suscetíveis introduzidos

no rebanho ou novilhas de primeira cria abortam (BISHOP et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 2001).

Entre os ruminantes, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de pastagens, alimentos e águas contaminadas, mas também pelo contato direto com o animal ou sêmen contaminados (ACHA; SZYFRES, 2001). Porém a transmissão vertical também ocorre (OMS, 1986), podendo desencadear a condição de “portador latente”, que é um fenômeno relatado numa frequência entre 1 e 9% das novilhas nascidas fêmeas infectadas (BISHOP et al., 1994). Essas novilhas apresentam-se sorologicamente negativas ou com títulos instáveis (NIELSEN; DUNCAN, 1990) e soroconvertem na metade da primeira prenhez. Neste caso a vacinação é ineficaz (BISHOP et al., 1994). Portadores não identificados, além de servirem como fonte de infecção para o rebanho, podem eliminar a bactéria pelo leite. O produto quando ingerido *in natura* ou após ser utilizado para fabricação de derivados sem a prévia pasteurização, pode causar brucelose no homem (USDA, 2006).

As perdas diretas provocadas pela brucelose para a indústria pecuária são decorrentes de abortamentos, com queda da produção de carne e leite, aumento do intervalo entre partos (de 11,5 para 20 meses), morte de bezerros, aumento na taxa de reposição dos animais. Provocam ainda restrições comerciais devido à vulnerabilidade dos produtos a serem comercializados, às barreiras sanitárias, diminuindo a competitividade no comércio exterior (PAULIN, 2006b).

O caráter zoonótico da doença também acarreta perdas de difícil quantificação, na maioria das vezes relacionadas ao custo do tratamento humano e ao período de ausência no trabalho durante a convalescença (PAULIN, 2000).

A prevenção da brucelose humana consiste no controle da brucelose animal (ACHA; SZYFRES, 1986), e a experiência acumulada com a vacina de uso mais difundido, a B19, permite concluir que quando se alcança 80% de cobertura vacinal, a prevalência será igual ou inferior a 2%, frequência que permite o incremento das ações de sacrifício dos animais reatores (ALTON et al., 1978; GARCIA-CARRILLO, 1984; ACHA; SZYFRES, 1986).

No Brasil, com o objetivo de baixar a prevalência e incidência de novos casos de brucelose e de tuberculose e criar um número significativo de propriedades certificadas que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário, foi criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT).

Uma das propostas técnicas do Programa é a vacinação de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, entre três e oito meses de idade, com a amostra B19. Em rebanhos certificados, recomenda-se que as bezerras sejam vacinadas com no máximo seis meses de idade, de forma a minimizar a persistência de anticorpos vacinais nos testes de sorodiagnóstico. A vacinação contra brucelose só poderá ser realizada sob responsabilidade de médicos veterinários, que deverão estar cadastrados no Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal de seu Estado de atuação. O PNCEBT é complementado pela certificação de rebanhos livres de brucelose e tuberculose ou certificação de rebanhos monitorados para brucelose e tuberculose, assim como o controle do trânsito de reprodutores e normas sanitárias para participação em exposições, feiras, leilões e outras aglomerações de animais; o credenciamento e capacitação de médicos veterinários; diagnóstico e apoio laboratorial e educação sanitária (BRASIL, 2007).

No final dos anos de 1930, Dr. John Buck isolou um microrganismo a partir do leite de uma vaca jérsei infectada, ao deixar a cultura em temperatura ambiente por um ano tornando-se naturalmente atenuada e estável. Buck denominou-a amostra 19, era a 19^a cultura de um lote usado na pesquisa para desenvolvimento de vacinas. Posteriormente, ao subcultivá-la, Dr. Buck descobriu que o microrganismo não causava mais a doença nos bovinos, embora lhes conferisse imunidade protetora. Em 1941, foi licenciada nos Estados Unidos e tem sido amplamente utilizada em bovinos (PAHO/WHO, 1999).

A vacina B19 é produzida a partir de células vivas que devem permanecer viáveis para sua eficiência. Também chamada anabortina, é produzida segundo normas internacionais com amostra viva de *B. abortus* estirpe B19 e tem sido a mais utilizada no mundo. A dose padrão única tradicionalmente recomendada para a produção desta vacina é 5×10^{10} ou 4 a 12×10^{10} células e deverá ser ministrada por via subcutânea (OMS, 1986; TIMONEY et al., 1988; BISHOP et al., 1994).

O eritritol ou eritrol é um poli álcool composto de quatro carbonos que serve como fonte de energia para a *B. abortus* (SPERRY; ROBERTSON, 1975; MEYER, 1967), que foi cristalizado a partir do líquido amniótico e alantoideano bovino (PEARCE et al., 1961). As brucelas não metabolizam diretamente o eritritol, mas a eritrose, açúcar simples resultante do desdobramento da eritrose, subproduto do eritritol (PAULIN, 2006b). O uso preferencial do eritritol é característica do gênero *Brucella* spp. Foi reportada a ausência, na B19, de D-eritrose-1-fosfato de-

hidrogenase, uma enzima crítica no mecanismo catabólico do eritritol, causando o acúmulo do produto tóxico intermediário, a D-eritrose 1-fosfato e uma depleção dos níveis de ATP, inibindo o crescimento bacteriano (ADAMS, 1990; SANGARI et al., 2000). O metabolismo do eritritol é a diferença mais conhecida e mais importante entre a cepa B19 e as cepas virulentas de *B. abortus* (SANGARI et al., 2000). Na cepa vacinal, o gene *ery*, de 702 pares de base (pb), apresenta-se deletado e esta seria a explicação para a sua sensibilidade ao eritritol (CORBEL, 1997). Porém, algumas estirpes de B19 são tolerantes ao eritritol e acredita-se que esta seja uma das causas do desenvolvimento de infecção persistente pela mesma, e subsequente abortamento (BISHOP et al., 1994; SANGARI et al., 1998).

Tem sido demonstrado que a estirpe B19 é 65 a 70 % efetiva na proteção contra a maioria dos níveis de exposição, se utilizada num rebanho por pelo menos sete anos na dose correta e na idade recomendada (PAHO/WHO, 1999). Corbel (1997) explica que sua atenuação e baixa patogenicidade derivam de perda do gene eritrose-1-fosfato de-hidrogenase durante a mutação espontânea ocorrida com a estirpe, e por isso não há produção da enzima D-Ery, o que leva à inibição da sua multiplicação no útero. Assim, a B19 não se beneficia da degradação do eritritol, tendo, inclusive, seu crescimento inibido pelo mesmo (ADAMS, 1990). Seu inconveniente é a presença da cadeia O, que induz anticorpos nos primeiros meses pós-vacinação, além do que é patogênica para bovídeos machos e outras espécies incluindo o homem. Leva os machos a permanecerem com títulos vacinais por toda vida, além de haver a possibilidade de desenvolverem orquite e epididimite (OMS, 1986).

Beckett e Mc Diarmid (1985) relataram que alguns animais abortaram após a vacinação com a B19, sendo que depois da bactéria ser isolada, multiplicou-se na presença de eritritol. Estes pesquisadores observaram também que as fêmeas bovinas vacinadas com $5,8 \times 10^9$ células no período de gestação apresentaram estirpe B19 no útero e conseqüentemente abortaram, e que as fêmeas prenhes vacinadas com 3×10^8 células não apresentaram efeito algum.

A estirpe B19 tem sido usada com resultados flutuantes que vão desde ótimo a um baixo nível de proteção, dependendo, principalmente, da qualidade do produto inoculado nos animais. Assim, a B19 deve ser mantida sob refrigeração durante sua distribuição, sendo imprescindível garantir sua viabilidade. Ainda, as características

da estirpe vacinal comercial comparada à estirpe original são essenciais para garantir sua potência ótima (PAHO/WHO, 1999).

A estirpe B19 produz resposta imunológica idêntica àquela resultante da infecção por estirpe de campo. Quando os bovinos são vacinados na idade preconizada pelo PNCEBT, os títulos de anticorpos declinam, chegando a negativar aos dois anos de idade. Entretanto, novilhas vacinadas numa idade superior à recomendada, tendem a ter títulos de anticorpos persistentes, confundindo o sorodiagnóstico de brucelose (PAHO/WHO, 1999).

Bezerras vacinadas com a B19 produzem tanto IgG quanto IgM. A IgM é a primeira classe de anticorpos a aparecer após a vacinação (5° - 7° dia) e a última a desaparecer (13° - 21° dia). A IgG é detectável entre 14° e 21° dia pós-vacinação, desaparecendo antes da IgM, com a máxima concentração entre o 28° e o 42° dia. Os animais infectados seguem esse mesmo modelo de produção de IgM, com a diferença de que nestes a IgG alcança títulos mais elevados e persiste por mais tempo, permanecendo detectável na fase crônica da doença (KRUZE, 1975; SAGARI, 1996).

Cheville et al. (1993), inocularam experimentalmente com B19 por via subcutânea um grupo de novilhas Polled Hereford com 10 meses de idade e reinocularam estes animais aos 22 meses de idade durante o quinto mês de gestação com a estirpe virulenta de *B. abortus* S2308. Observaram que todas as novilhas estavam protegidas, não ocorrendo abortamento e tendo ainda os bezerros nascidos livres de *B. abortus*, a qual não foi isolada após o parto, concluindo que a estirpe B19 continua induzindo proteção quando administrada nos animais com 10 meses de idade.

As novilhas vacinadas com a cepa B19 na idade recomendada, geralmente não são testadas sorologicamente até 18-24 meses de idade.

A proteção induzida pela vacinação de animais adultos é comparável ou maior que a resposta induzida pela vacinação das novilhas (ALTON et al., 1980), e tais achados tem levado à vacinação de animais adultos com a dose reduzida da cepa B19 em programas de controle da brucelose em outros países. No entanto, este tipo de vacinação pode levar a títulos de anticorpos persistentes, infecções induzidas pela cepa B19 e abortamentos (SANGARI et al., 1996; GEONG; ROBERTSON, 2000).

Nicoletti (1990), afirma que, além das vacinas vivas promoverem imunidade mais completa e duradoura em relação às vacinas mortas por estimular maior ação macrofágica, a estirpe B19 multiplica-se no hospedeiro por períodos limitados e a imunidade conferida é essencialmente do tipo celular.

A detecção do agente infeccioso confere o diagnóstico decisivo. Entretanto, devido às propriedades biológicas da brucela, os métodos de cultivo são demorados, podendo falhar quando a carga bacteriana for baixa (GALLIEN et al., 1998). Além disso, o isolamento pode apresentar dificuldades como a contaminação dos tecidos fetais ou apresentar perigo de infecção para os laboratoristas (CORTEZ et al., 2001).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido testada como alternativa na detecção de *Brucella* spp. em diversos substratos (FEKETE et al., 1992; LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; ROMERO et al., 1995 a; MATAR et al., 1996; DE GARCIA, 1997; QUEIPO-ORTUÑO et al., 1997; GALLIEN et al., 1998; SERPE et al., 1999). Apresenta rapidez de execução, alta sensibilidade e especificidade, possibilidade de processamento de amostras clínicas contaminadas, além de detectar o DNA em pequenas quantidades de microrganismos que não necessitam estar viáveis (ERLICH et al., 1991). Além disso, a PCR é um método eficiente e rápido que pode ser usado para a detecção de organismos patogênicos não apenas em animais infectados, mas também em alimentos (GALLIEN et al., 1998).

Cortez et al. (2001) obteve limiar de detecção de 2 UFC/mL numa reação em cadeia pela polimerase utilizando-se primers gênero-específico para *Brucella* spp. a partir de conteúdo gástrico e órgãos de fetos abortados. Em outro estudo, aproximadamente 20 células (equivalente a aproximadamente 60 fg de DNA bacteriano) foram detectadas pela PCR com primers gênero-específico para *Brucella* spp. (BAILY et al., 1992).

Leal-Klevezas et al (1995) desenvolveram a PCR para detecção de *Brucella* spp. a partir de sangue e leite de animais infectados, demonstrando a eficiência da técnica para fluidos corpóreos. Romero et al. (1995 a e b) testaram pela PCR amostras de leite de vacas infectadas no campo observando sensibilidade e especificidade relativas de 87,5% e 100%, respectivamente.

Análises genéticas de espécies de *Brucella* spp., incluindo o polimorfismo do genoma, têm mostrado estreita similaridade entre as mesmas, o que torna a identificação difícil. Devido à pequena variação antigênica e a diferenciação das espécies e cepas de *Brucella* spp. ser baseada nas características biológicas e

fisiológicas, o procedimento se torna trabalhoso e demorado (BRICKER; HALLING, 1994). Visando sobrepor essas dificuldades, Bricker; Halling (1994) descreveram um método de PCR, denominado AMOS PCR, que identificou e diferenciou a maior parte das espécies de *Brucella* spp. e biotipos encontrados nos Estados Unidos, através de um coquetel de "primers". O método baseia-se nas observações de que o elemento genético repetitivo IS 711 é único do gênero *Brucella* e, para a maioria das espécies, pelo menos uma cópia deste elemento ocorre num locus cromossomal único, espécie ou biotipo específico. Ewalt; Bricker (2000) validaram a AMOS PCR para a diferenciação de *B.abortus* em estirpe de campo ou vacinal.

O período de excreção e persistência da estirpe B19 e seu efeito sobre animais comunicantes e suscetíveis foram estudados somente com base no sorodiagnóstico e no isolamento bacteriano. Meyer; Nelson (1969), detectaram cultura positiva por mais de três anos no leite de fêmeas bovinas vacinadas com B19 e Manthei (1952) observou que em testes sorológicos e isolamento bacteriano de leite de fêmeas bovinas vacinadas, a persistência da infecção por B19 após um ano ou mais é baixa.

A detecção das cepas de *B. abortus* B19 através da técnica de PCR, devido à elevada sensibilidade e especificidade, torna-se fundamental para o melhor monitoramento dos animais. A PCR permitirá esclarecer dúvidas freqüentes de médicos veterinários e criadores sobre a persistência da *B. abortus* B19 no animal vacinado e o efeito da eliminação da estirpe B19 para o ambiente representando risco de infecção para fêmeas e machos de rebanhos sorologicamente negativos. Além disto, deve-se esclarecer qual o potencial de risco zoonótico da excreção da vacina B19.

Durante o ciclo estral ocorre uma seqüência de eventos hormonais que podem resultar em maior ou menor resistência do trato reprodutor feminino as agressões e/ou contaminações por patógenos. O mecanismo pelo qual o útero responde aos agentes agressores envolve uma interação entre os componentes da resposta imunológica celular, representada sobretudo pela fagocitose e morte pelos macrófagos e neutrófilos uterinos, resposta humoral, mecanismos físicos e drenagem linfática. Durante a fase estrogênica, a renovação celular promove limpeza especialmente do útero, mas a fase progesterônica caracteriza-se pelo favorecimento do ambiente uterino para a sobrevivência de microrganismos (GALINDO, 2002).

Em relação ao mecanismo celular envolvido na defesa uterina, acredita-se que o estrógeno estimule a função dos neutrófilos, enquanto a progesterona possui ação oposta. O efeito esperado quando os níveis estrogênicos prevalecem sobre os progesterônicos é a ativação da quimiotaxia local pelo aumento de afluxo sanguíneo uterino, tornando mais eficiente a resposta miometrial à ação da ocitocina (HUSSAIN; DANIEL, 1992).

Devido à escassez de dados sobre a importância, frequência e intensidade da excreção da estirpe B19 de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias que haviam sido vacinadas entre três e oito meses e sorologicamente negativas, objetivou-se estudar um grupo de animais nessas condições.

2 OBJETIVOS

De um rebanho leiteiro com manejo sanitário, reprodutivo e zootécnico controlados, composto por fêmeas adultas variando entre três a nove anos de idade, que receberam vacina contra brucelose (B19) entre 3-8 meses de idade, objetivou-se:

1-Monitorar a excreção da estirpe vacinal B19 empregando-se exames sorológicos, bacteriológicos e PCR em amostras de leite, sangue e urina colhidas em vários períodos de um ciclo reprodutivo completo.

2-Correlacionar o período de excreção da estirpe vacinal B19 pelo leite e urina com a faixa etária dos animais.

3-Correlacionar o período de excreção da estirpe vacinal B19 pelo leite e urina com as fases hormonais de um ciclo reprodutivo completo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Rebanho experimental

A Fazenda Palmeiras instalada no Município de Nova Odessa - SP, pertencente ao Instituto de Zootecnia da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do Estado de São Paulo, foi selecionada para participar deste trabalho por possuir um rebanho leiteiro com finalidade experimental, com rigorosa identificação individual dos animais, controlados para brucelose e demais doenças reprodutivas bacterianas, virais e parasitárias. As fêmeas deste plantel são sistematicamente vacinadas contra brucelose com vacina viva atenuada B19 entre três e oito meses de idade, de acordo com o PNCEBT, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2007).

Antes do início do experimento, foi identificada a sistemática de trabalho da fazenda:

- 1-listagem dos funcionários e seus horários de trabalho com os animais;
- 2- manejo sanitário: exames laboratoriais, desinfecção e planilha de vacinação;
- 3-manejo zootécnico: nutrição, condições de ordenha com destaque para as fêmeas em lactação e secas;
- 3- manejo reprodutivo: protocolo de sincronização de cio e inseminação artificial, taxas de prenhez e parição.

Manejo Zootécnico:

O manejo das vacas em lactação é realizado de acordo com a taxa de produção e com a fase de lactação. Trinta dias após o parto e durante aproximadamente quatro meses são realizadas três ordenhas diárias do tipo mecânica modelo *tanden*, como pode ser observado na figura 1. No restante do período, são feitas duas ordenhas.

Figura 1 – Sala de ordenha

A ração é formulada segundo as recomendações do *National Research Council* (NRC, 1989). O arraçoamento das vacas em lactação é realizado duas vezes ao dia com fornecimento de silagem de sorgo e concentrado contendo 28% de proteína, calculada de acordo com a produção de leite dos lotes.

Figura 2 – Sistema de semiconfinamento, animais a pasto e estabulados.

O manejo dos bezerros do nascimento até os 60 dias de vida é realizado em baias individuais elevadas 80 cm do chão, para facilitar a higienização e desinfecção do local. Os animais são retirados da vaca oito horas após o nascimento, garantindo que tenham mamado o colostro. Durante um período de 60 dias os bezerros recebem leite duas vezes ao dia no balde e ração granulada a vontade e 15 dias antes do desmame recebem feno de *Coast cross* picado no cocho.

No desmame, as fêmeas são transferidas para baias coletivas, onde recebem alimentação no cocho a base de feno e ração, duas vezes ao dia (Figura 2).

As novilhas de reposição, após atingirem a idade de um ano e meio, são distribuídas de acordo com o peso e a idade em piquetes de aproximadamente um hectare composto por *Panicum máximo* cv Tanzânia, como pode ser observado na figura 3. No período da seca (maio a agosto), recebem silagem de sorgo e concentrado contendo 28% de proteína bruta, duas vezes ao dia.

Figura 3 – Piquetes das novilhas de reposição.

Manejo Reprodutivo:

Ao atingirem 350 kg, as matrizes passam a ser inseminadas artificialmente durante a estação de monta com duração de três meses cada (setembro a novembro). A sincronização do cio foi realizada através da aplicação de Cloprostenol sódico (Ciosin®). Os animais receberam a primeira dose (3mL via intramuscular), seguida por observação de sinais de cio com uso de rufião e inseminação artificial dos animais que apresentaram cio. Onze dias após, as fêmeas que não foram inseminadas receberam a segunda dose segundo protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF - 72 e 96 horas). O diagnóstico de gestação foi realizado aos 90 dias após a inseminação artificial por palpação retal.

Manejo Sanitário:

O rebanho possui credenciamento para produção de leite tipo B, por este motivo os exames de Brucelose e Tuberculose são realizados obrigatoriamente a cada seis meses e considerados de importância máxima.

A vacina para brucelose é realizada nas bezerras entre três e seis meses de idade.

Os animais também são vacinados contra Febre Aftosa e Raiva, de acordo com o programa oficial de combate destas doenças, segundo recomendações do MAPA. A vacinação contra clostridioses (polivalente) é realizada aos seis meses de idade, com reforço um mês após a primeira dose e revacinação anual.

A escolha do carrapaticida é baseada no resultado do biocarrapaticidograma e as aplicações são realizadas sistematicamente, quando os carrapatos estão no estado de pré-engurgitamento. O controle de verminose é realizado pela aplicação de endectocidas.

A prevenção da mastite é realizada pela higiene dos tetos antes da ordenha, pelo teste da caneca telada e desinfecção dos tetos após cada ordenha com solução iodada anti-séptica. Mensalmente é realizado o exame de Contagem de Células Somáticas (CCS).

As condutas sanitárias para biosseguridade são as seguintes:

- rígido controle de trânsito de animais na fazenda;
- sêmen empregado na inseminação artificial – industrializado e certificado livre de agentes patogênicos para a reprodução bovina (vírus e bactérias);
- monitoramento semestral por sorodiagnóstico de Brucelose segundo PNCEBT
- monitoramento anual por sorodiagnóstico para leptospirose por amostragem das fêmeas em lactação;
- monitoramento semestral por sorodiagnóstico de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarréia Viral Bovina (BVD);
- monitoramento semestral de Tuberculose segundo o PNCEBT.

3.1.2 Formação dos grupos de animais

Foram utilizadas 14 fêmeas bovinas, compostas das raças Pardo Suíça e Holandesa Preto e Branco divididas em três grupos de acordo com a faixa etária:

Grupo 1: sete animais de três a quatro anos.

Grupo 2: três animais de cinco a seis anos.

Grupo 3: quatro animais de sete a nove anos.

3.1.3 Colheita das amostras clínicas

A colheita das amostras clínica (sangue, leite e urina) ocorreu simultaneamente e seguiu o cronograma de acordo com as fases hormonais (Anexo A), durante o período de 12 meses, visando o acompanhamento de um ciclo reprodutivo completo, ou seja, desde sincronização do cio e fecundação, até 30 dias após o parto, como pode ser observado no quadro 1. Todas as amostras clínicas foram mantidas a – 20° C até a realização dos exames.

Amostras:

Soro: Foi realizada colheita mensal de sangue pela venopunção da cauda utilizando sistema a vácuo estéril sem anticoagulante, para a obtenção de soro sangüíneo. Antes da ordenha de cada animal foram colhidos de forma asséptica cerca de 10 mL de sangue, sendo dessorado em temperatura ambiente.

Leite: Foram colhidos mensalmente, de forma asséptica cerca de 5 mL de leite durante a ordenha, de forma asséptica.

Urina: Foram colhidos mensalmente, de forma asséptica cerca de 5mL antes ou após a ordenha.

Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico APTA/SAA.

Estro	Pós estro / Metaestro	Interestro / Diestro	Pré Parto									Parto	Pós Parto	
			Período Gestacional em Dias											
Cio	18 h pós-cio	22º dia pós cio	90	120	150	180	210	250	260	270	280	Parto	15º dia pós- parto	30º dia pós- parto
Setembro			Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio		Junho		Julho		

Quadro 1—Períodos de colheitas de amostras de sangue, urina e leite de fêmeas bovinas segundo as fases de um ciclo reprodutivo completo-São Paulo-2007.

3.2 Testes Sorológicos para Diagnóstico da Brucelose Bovina

Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), o Teste 2-Mercaptoetanol (ME), Teste de Soroaglutinação Lenta em Tubos (SLT), o Teste de Fixação do Complemento (FC) e o Teste do Anel em Leite (TAL) foram executados e interpretados conforme Alton et al. (1988), respeitando a metodologia de interpretação contida no PNCEBT, em que os resultados dos testes ME e SLT são avaliados conjuntamente (BRASIL, 2007). Sua execução teve como objetivos selecionar as fêmeas bovinas sorologicamente negativas do rebanho e seu monitoramento, para garantir que o mesmo tenha se mantido sorologicamente negativo ao longo do período experimental.

3.3 Cultivo Microbiológico para Isolamento de *Brucella* spp.

No método de cultivo, as amostras de leite e urina foram semeadas em ágar *Brucella* acrescido de 5 % de sangue desfibrinado de carneiro com e sem a adição de uma mistura antibiótica composta de 10.000 UI/L de polimixina B, 15.000 UI/L de bacitracina, 0,005 g/L de novobiocina e 0,02 g/L de cicloheximida. As placas inoculadas foram incubadas sob microaerofilia e aerobiose, a 37 °C por até 10 dias (GENOVEZ et al., 1993).

As culturas suspeitas foram identificadas segundo CARTER; CHENGAPPA (1991) e Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

3.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Multiplex PCR-*Brucella abortus* e *Brucella abortus* B19

3.4.1 Extração de DNA das amostras de leite e urina

A extração de DNA das amostras de leite foi realizada com reagente comercial DNAzol (Invitrogen®), adaptado de Chomczynski (1993).

A extração de DNA das amostras de urina foi realizada pelo protocolo de fervura-fenol, adaptado de Cortez et al. (2001).

3.4.2 Reação de PCR para *Brucella* spp.

A técnica de PCR foi empregada para detectar *Brucella* spp. em amostras de leite e urina utilizando-se o par de "primers" gênero-específico B4 e B5 descrito por Baily et al. (1992), que amplifica fragmentos de 223 pb, e cujas seqüências podem ser observadas no quadro 2.

“PRIMERS”		SEQUÊNCIA
B4	5´	TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3´
B5	5´	GTC TGG ACT TTC CGT TCG CGC 3´

Quadro 2 – Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção de *Brucella* spp.

A amplificação das amostras foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Cortez et al. (2001).

A análise do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0 % (p/v), utilizando-se tampão de corrida TBE 0,5 X (0,045 M TRIS-Borato e 1 mM de EDTA pH 8,0), segundo Sambrook et al. (1989) e o gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm. O gel foi corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, posteriormente fotografado sob luz ultravioleta (300-320 nm) pelo sistema de foto-documentação (Câmera kodak Digital DC/120 Zoom) e analisado com o software 1 D Image Analysis (Kodak Digital Science).

Como controle positivo da reação para brucelose, foi empregada uma suspensão bacteriana correspondente à escala oito de Mac Farland ($2,3 \times 10^9$ bact / mL) em cultura da estirpe padrão de *B. abortus* ATCC 544.

Como controle negativo da PCR foi utilizada a mistura da reação da PCR sem DNA, contendo água ultrapura.

3.4.3 Multiplex PCR para diferenciação da estirpe, em vacinal ou campo

A técnica de PCR para diferenciação da origem da estirpe foi realizada a partir do DNA extraído das amostras positivas na PCR para *Brucella* spp., empregando-se os “primers” *ery* 1 e *ery* 2 descritos por Sangari, Garcia-Lobo e Agüero (1994).

A amplificação das amostras foi padronizada, de acordo com o protocolo proposto por Bricker;Halling (1995), utilizando-se o reagente Máster Mix da Eppendorf ®.

As seqüências dos “primers” utilizados podem ser observadas no quadro 3.

“PRIMERS”	SEQUÊNCIA
ERI 1	5´ GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA 3´
ERI 2	5´ CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA 3´

Quadro 3 - Seqüência dos “primers” utilizados para a diferenciação da origem da estirpe de *Brucella abortus* de campo ou vacinal (B19).

3.5 Dosagens hormonais

A fase folicular é dominada pelo estrogênio produzido no folículo ovariano, terminando com a ovulação e dando início à fase luteínica com o máximo desenvolvimento do corpo lúteo. Com a luteólise, ocorre o declínio da progesterona e o início de uma nova fase folicular. Na fêmea bovina, a gestação é mantida pela progesterona produzida tanto pelo corpo lúteo quanto pela placenta, cuja ligação materno-fetal se estabelece ao redor de 40 dias da gestação (placentação).

Tendo em vista as fases do ciclo estral, as dosagens de estrógeno e progesterona foram realizadas através do teste imunoenzimático ELISA de competição, seguindo a metodologia descrita no manual dos kits comerciais de ELISA (Direct Estradiol ELISA KIT e Progesterona ELISA KIT) (Diagnostics Biochem Canadá, 2004).

O Kit para dosagem de estradiol foi aplicado do cio ao 90º dia e o kit para dosagem de progesterona do 120º dia ao 30º dia pós-parto, quando a concentração de progesterona cai bruscamente.

A densidade óptica (DO) de cada amostra foi mensurada utilizando-se o leitor de ELISA Multiskan Ascent V 1.24 com filtro de 450nm. A intensidade da coloração formada foi inversamente proporcional à concentração de progesterona ou estrógeno presente nas amostras.

Os valores de DO encontrados nas amostras foram lidos diretamente a partir da curva de calibração segundo o programa ASCENT INDEX (Figura 4).

Figura 4 - Teste de ELISA C com os kits comerciais de ELISA para estrógeno e progesterona

3.6 Tratamento Estatístico

Para a comparação das proporções de amostras positivas entre os grupos experimentais (G1, G2 e G3) e entre as diversas fases, foi utilizado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado para amostras independentes; para amostras dependentes, foi utilizado o teste de McNemar (ZAR, 1999).

Para comparação dos valores medianos das dosagens hormonais entre os grupos experimentais, inicialmente foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Como os valores das dosagens hormonais não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos, e o teste de Mann-Whitney U para as comparações múltiplas (ZAR, 1999). Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de 0,05. Para

leitura dos resultados, foram utilizados os programas *SPSS for Windows* versão 13.0 e Epiinfo versão 6.04.

4 RESULTADOS

As condições de manejo zootécnico, sanitário e reprodutivo adotados pela Fazenda Palmeira permitiram, com confiabilidade dos dados, a realização do presente trabalho, principalmente com relação ao registro dos animais (identificação, origem, vacinação, inseminação, parição e lactação).

A formação dos grupos atendeu ao propósito deste trabalho em relação à idade dos animais investigados, embora a dinâmica do rebanho não permitiu a formação de grupos com maior número de animais.

A tabela 1 apresenta os resultados da aplicação dos testes sorológico, imunológico, bacteriológico e PCR em amostras de soro, leite e urina dos três grupos de fêmeas bovinas de acordo com a faixa etária, em relação às fases estrogênicas e progesterônicas de um ciclo reprodutivo completo, desde o cio até 30 dias pós-parto.

Tabela 1- Exames laboratoriais para brucelose aplicados às amostras de sangue, urina e leite de três grupos de fêmeas bovinas segundo as faixas etárias e as dosagens hormonais, durante as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007 (continua)

GRUPO	ANIMAIS	AMOSTRA	EXAMES	CIO	18hs pós- cio	22° dia pós- cio	PERÍODO GESTACIONAL EM DIAS									PARIÇÃO			
							90	120	150 *	180	210	250	260	270	280	Parto	15° dia pós- parto	30° dia pós- parto	
G1 (3-4anos)	926	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			DH	586	250	200	<300	1200	11000	11000	11000	11000	11000	7000	5000	5500	5500		
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			PCR	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N
		LEITE	TAL	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1159	SORO	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	400	400	3000	1400	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	5500	10000	10000	11000	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P
		LEITE	TAL	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1161	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	400	<300	3000	3000	12000	12000	12000	12000	12000	1600	11000	5500	5000	5000	1600	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
		LEITE	TAL	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1163	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	586	586	400	<3200	12000	12000	7000	4200	11000	12000	10000	12000	1600	5500	5500	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	P	P	P	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N	N	N
		LEITE	TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	
				Dosagem de Estrogênio				Dosagem de Progesterona											

Tabela 1- Exames laboratoriais para brucelose aplicados às amostras de sangue, urina e leite de três grupos de fêmeas bovinas segundo as faixas etárias e as dosagens hormonais, durante as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007 (continuação)

GRUPO	ANIMAIS	AMOSTRA	EXAMES	CIO	18hs pós- cio	22° dia pós- cio	PERÍODO GESTACIONAL EM DIAS									PARIÇÃO			
							90	120	150 *	180	210	250	260	270	280	Parto	15° dia pós- parto	30° dia pós- parto	
G1 (3-4anos)	1167	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			DH	1400	<300	586	1400	11000	11000	11000	10000	7000	5500	5000	5000	<300	<300	<300	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N	P	N	P	N	N	N
		LEITE	TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1176	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	400	<300	400	586	12000	12000	12000	11000	12000	5000	5000	1000	1000	1600	5000	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	P
		LEITE	TAL	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1178	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	<300	400	586	400	12000	10000	5500	300	11000	12000	5500	1000	<300	1000	5500	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	N	P	P	N	P	N	N	N	P	P	N	N	P	N	N
		LEITE	TAL	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
Mediana da DH				400	300	586	1400	12000	12000	11000	11000	11000	11000	10000	5500	1600	5000	5500	
				Dosagem de Estrogênio				Dosagem de Progesterona											

Tabela 1- Exames laboratoriais para brucelose aplicados às amostras de sangue, urina e leite de três grupos de fêmeas bovinas segundo as faixas etárias e as dosagens hormonais, durante as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007 (continuação)

GRUPO	ANIMAIS	AMOSTRA	EXAMES	CIO	18hs pós- cio	22° dia pós- cio	PERÍODO GESTACIONAL EM DIAS									PARIÇÃO			
							90	120	150 *	180	210	250	260	270	280	Parto	15° dia pós- parto	30° dia pós- parto	
G2 (5-6 anos)	878	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			DH	400	400	400	<300	11000	10000	11000	11000	7000	5000	5500	5000	<300	<300	<300	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
			LEITE	TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		BAC		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		PCR		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1112	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	1400	400	586	1400	12000	12000	12000	12000	11000	11000	5500	5000	1600	10000	<300	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	P	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
			LEITE	TAL	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		BAC		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		PCR		N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1131	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			DH	250	<300	<300	400	10000	11000	7000	7000	1000	<300	5000	1600	10000	10000	5000	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N
			LEITE	TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		BAC		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		PCR		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Mediana da DH				400	400	400	400	11000	11000	11000	11000	7000	5000	5500	5000	1600	10000	300	
				Dosagem de Estrogênio				Dosagem de Progesterona											

Tabela 1- Exames laboratoriais para brucelose aplicados às amostras de sangue, urina e leite de três grupos de fêmeas bovinas segundo as faixas etárias e as dosagens hormonais, durante as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007 (conclusão)

GRUPO	ANIMAIS	AMOSTRA	EXAMES	CIO	18hs pós- cio	22° dia pós- cio	PERÍODO GESTACIONAL EM DIAS									PARIÇÃO			
							90	120	150*	180	210	250	260	270	280	Parto	15° dia pós- parto	30° dia pós- parto	
G3 (7-9 anos)	801	SANGUE	AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
			DH	586	400	400	586	5000	10000	10000	11000	10000	7000	5000	5500	<300	<300	1000	
		URINA	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	P	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	P	P
		LEITE	TAL	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	811	SANGUE	PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		URINA	DH	586	586	250	586	11000	10000	10000	10000	7000	4000	5000	<300	<300	<300	<300	
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		LEITE	PCR	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N
			TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
	855	SANGUE	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
		URINA	TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		LEITE	PCR	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			AAT	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1100	SANGUE	DH	400	586	400	400	5500	8000	1500	7000	1500	5000	5500	5000	<300	1600	5500	
			BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		URINA	PCR	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	N	P	N	N	P	N
			TAL	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		LEITE	BAC	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
			PCR	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
Mediana da DH				586	586	325	493	7750	9000	7000	10000	6250	6000	5250	5000	300	300	650	
				Dosagem de Estrogênio				Dosagem de Progesterona											

AAT (Teste do Antígeno Acidificado Tamponado), DH (Dosagem Hormonal em pg/ml), BAC (exame bacteriológico), PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), TAL (Teste do Anel em Leite), P (Positivo) e N (Negativo).

Pela análise da tabela 1, verifica-se que não houve correlação entre as técnicas aplicadas às amostras clínicas. Por esta tabela, observa-se que todos os animais mantiveram-se sorologicamente negativos para brucelose pela AAT durante o período experimental.

As amostras pareadas de leite (210) e urina (210) submetidas ao exame bacteriológico resultaram negativas para *Brucella* spp. sendo observada nas amostras de leite grande contaminação por outros gêneros bacterianos (*Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp).

O TAL foi capaz de revelar 13/210 (6,2%) amostras positivas, aleatoriamente distribuídas ao longo das colheitas, quer seja na fase estrogênica ou progesterônica do ciclo reprodutivo. G1 apresentou 8/105 (7,6%) positivos, G2 1/45 (2,2%) e G3 4/60 (6,7%), sem haver diferença significativa entre eles.

Pela PCR, do total de amostras examinadas, em 86/420 (20,5%) pôde ser detectado DNA de *Brucella* spp (Figura 5 e 6). No leite, em 12/210 (5,7%) amostras mostraram-se positivas, sendo G1 com 9/105 (8,6%), G2 com 1/45 (2,2%) e G3 com 2/60 (3,3%) (tabela 3). Estes números ocorreram mais freqüentemente do cio até 150 dias de gestação e pós-parto 10/150 (6,7%), e de 150 dias de gestação ao parto 2/60 (3,4%). Na urina, 74/210 (35,2%) mostraram resultados positivos, significativamente maiores do que no leite, onde G1 aparece com 36/105 (34,3%) ($p < 0,001$); G2 com 13/45 (28,9%) ($p = 0,001$) e G3 com 25/60 (41,7%) ($p < 0,001$).

A PCR- Multiplex empregada na diferenciação para B19, identificou todas as 86 amostras positivas como sendo provenientes de vacinação com B19, conforme mostra figura 7, constatando sua excreção intermitente pela urina e persistência no organismo de fêmeas bovinas que haviam sido vacinadas entre três a oito meses, até nove anos de idade.

Considerando-se o total de fêmeas excretoras de *B. abortus* estirpe B19 pela urina detectadas pela PCR sobre o total de amostras de urina colhidas nos períodos relativos às fases hormonais do ciclo reprodutivo, ou seja; nas fases predominantemente estrogênica (do cio a 90 dias de gestação), fase predominantemente progesterônica (de 90 dias de gestação ao parto) e novamente predominantemente estrogênica (até 30 dias pós-parto), observa-se que a maior freqüência (50 a 54,2%) de urinas positivas ocorreu do cio até 150 dias de gestação, ou seja, da fase estrogênica até parte da fase progesterônica, tendo sua freqüência diminuído para 14,3 a 28,6% na fase predominantemente progesterônica e voltando

a aumentar no pós-parto, novamente fase predominantemente estrogênica (41,1 a 53,1%). Ou seja, as excreções de B19 ocorreram até 150 dias de gestação e no pós-parto, sendo a diferença significativa em relação ao período intermediário para os grupo G1 ($p=0,005$) e G2 ($p=0,15$) (Tabela 2). G3 não mostrou significância estatística, talvez pelo pequeno número de animais ($n=4$).

Tabela 2- Proporção de fêmeas bovinas segundo a faixa etária, excretoras de *Brucella abortus* estirpe B19 pela urina, detectada pela PCR, segundo as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007

GRUPOS	Cio a 150 dias de gestação	Cio a 150 dias de gestação e 30 dias pós-parto	Após 150 dias de gestação ao parto
G1 (3-4 ANOS)	21/42* (50%)	23/56 (41,1%)	13/49 (26,5%)
G2 (5-6 ANOS)	9/18 (50%)	10/24 (41,7%)	3/21 (14,3%)
G3 (7-9 ANOS)	13/24 (54,2%)	17/32 (53,1%)	8/28 (28,6%)

* total de amostras de urina colhidas no período por grupo de animais

Tabela 3- Proporção de fêmeas bovinas segundo a faixa etária, excretoras de *Brucella abortus* estirpe B19 pela urina e pelo leite, detectada pela PCR- São Paulo- 2007

GRUPOS	PCR- LEITE	PCR- URINA
G1 (3-4 ANOS)	9/105* (8,5%)	36/105* (34,8)
G2 (5-6 ANOS)	1/45 (2,2 %)	13/45 (28,8%)
G3 (7-9 ANOS)	2/60 (3,3%)	25/60 (41,6%)
TOTAL	12/210 (5,7%)	74/210 (35,2%)

* total de amostras de urina e leite colhidas no período por grupo de animais

Figura 5 - Aplicação da técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY ET AL., 1992) aplicada às amostras de urina, utilizando extração de DNA por fervura- São Paulo- 2007

Figura 6 - Aplicação da técnica de PCR com os “primers” B₄ e B₅ (BAILY ET AL., 1992) aplicada às amostras de leite, utilizando extração de DNA por DNAzol- São Paulo- 2007

Figura 7 -Aplicação da técnica de PCR com os “primers” *ery* 1 e *ery* 2 (BRICKER; HALLING, 1995) aplicada às amostras de urina, utilizando extração de DNA por fervura- São Paulo- 2007

A tabela 4 mostra os valores medianos das dosagens hormonais nos períodos predominantemente estrogênicos e progesterônicos de um ciclo reprodutivo completo, nos três grupos de fêmeas bovinas de faixas etárias distintas. Em cada período os grupos foram comparados em relação ao valor mediano das dosagens hormonais, verificando-se diferença estatística apenas nos período de 150 e 250 dias de gestação, entre os grupos G1 e G2 ($p=0,012$), não havendo significância no G3.

Tabela 4- Dosagens hormonais (mediana) de três grupos de fêmeas bovinas segundo a faixa etária durante as fases de um ciclo reprodutivo completo- São Paulo- 2007

GRUPO	CIO	18hs pós-cio	22° dia pós-cio	PERÍODO GESTACIONAL EM DIAS									PARIÇÃO		
				90	120	150	180	210	250	260	270	280	Parto	15° dia pós-parto	30° dia pós-parto
G1 (3-4 ANOS)	400	300	586	1400	12000	12000	11000	11000	11000	11000	10000	5500	1600	5000	5500
G2 (5-6 ANOS)	400	400	400	400	11000	11000	11000	11000	7000	5000	5500	5000	1600	10000	300
G3 (7-9 ANOS)	586	586	325	493	7750	9000	7000	10000	6250	6000	5250	5000	300	300	650
	FASE ESTROGÊNICA*			FASE PROGESTERÔNICA									FASE ESTROGÊNICA		

DH (Dosagem Hormonal em pg/ml)

*placentação ocorre ao 40 dias de gestação

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas a proporção e a frequência de excreção da *B. abortus* estirpe B19 de 14 fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas entre três e oito meses de idade, durante um ciclo reprodutivo completo, monitorando-se os animais com testes diagnósticos diretos (isolamento bacteriano e PCR) e indiretos (sorodiagnóstico para *Brucella abortus*).

O diagnóstico definitivo de qualquer doença infecciosa é obtido por isolamento e identificação do agente (BRICKER, 2002). No entanto, os métodos diretos são trabalhosos e onerosos quando são aplicados a rebanhos. Assim, os programas de combate à brucelose baseiam-se no sorodiagnóstico, levando-se em conta na escolha dos testes a serem aplicados, as suas características intrínsecas, o custo, a praticidade de execução e a situação epidemiológica da doença na região (PAULIN, 2006a). Os testes oficiais do PNCEBT do Brasil são AAT, ME e FC (BRASIL, 2006).

O teste mais difundido é AAT, por ser um teste qualitativo, rápido, barato, de simples execução e por possuir ótima sensibilidade e boa especificidade (KRUZE, 1975). A OIE refere que o AAT é a melhor alternativa para o diagnóstico em massa (OIE, 2006).

No monitoramento sorológico dos animais estudados não foi revelada positividade para *B. abortus* ao AAT no total de 210 amostras de soro sanguíneo analisadas, não sendo necessário à realização de testes complementares, como ME e FC. Uma vez que a idade dos animais selecionados neste estudo foi maior que três anos (acima de 24 meses cuja interferência vacinal ainda pode ocorrer), os resultados sorológicos negativos confirmam tratar-se de um rebanho livre de brucelose.

O PNCEBT também recomenda a utilização do TAL para o monitoramento de rebanhos leiteiros. O teste revela anticorpos da classe IgA presentes no leite, que ficam aderidos às moléculas de gordura. Quando o anticorpo interage com o antígeno corado (tetrazólio), forma-se malha de aglutinação que flutua junto com a gordura para a superfície da amostra, revelando o anel colorido. É um teste prático,

barato e de alta sensibilidade, sendo empregado na vigilância epidemiológica para controlar sistematicamente áreas livres. (NIELSEN, 1995; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Porém, quando realizado em amostras individuais, pode-se obter grandes proporções de falso-positivos, o que pode ser corrigido diluindo as amostras de leite a serem testadas com leite negativo na proporção de 1:10 e confirmar o teste. Neste caso, títulos $\geq 1:16$ podem estar relacionados à presença de *B. abortus* no leite (BISHOP et al., 1994).

A alta prevalência de mastite é um dos fatores que levam a resultados falso-positivos; assim como a alta proporção de vacas em lactação precoce ou tardia; vacinação recente com cepa B19 (entre três – quatro meses); e acidez do leite. O período e a temperatura em que as amostras são armazenadas (principalmente em calor excessivo, acima de cinco minutos a 45°C) também podem resultar em falso-negativos (BISHOP et al., 1994).

Apenas 13 das 210 amostras de leite responderam positivamente ao TAL ao longo do experimento; sendo que o grupo de animais de três a quatro anos de idade (G1) apresentou o maior número de amostras positivas, sem, contudo significar relação com a idade dos animais ou mesmo com a fase hormonal do ciclo reprodutivo.

Atualmente, no Brasil, está em vigor o Regulamento Técnico do PNCEBT, publicado na Instrução Normativa nº 6, de oito de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004), que obriga a vacinação com B19 de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, na faixa etária de três a oito meses. Neste regulamento, o Comitê de Especialistas em Padrões Biológicos da OMS, em 1970, padronizou que a dose da vacina B19(2 mL) deve conter 4 a 12×10^{10} células por animal, ministrada por via subcutânea.

A prevalência do título vacinal está diretamente relacionada com a idade em que o animal é vacinado. Animais vacinados aos dois e três meses de idade tornam-se sorologicamente negativos três meses após a vacinação; os vacinados aos quatro meses após quatro aos cinco meses; aqueles vacinados aos seis meses após oito meses; e os vacinados aos oito meses, aproximadamente aos 12 meses após a vacinação (ORNELA SANTOS et al., 1975).

Animais vacinados aos dois e três meses de idade desenvolvem imunidade similar àqueles vacinados entre quatro e oito meses de idade, com menor período de persistência de anticorpos pós-vacinais, que poderiam mascarar os resultados de soroaglutinação (ORNELA SANTOS et al., 1975). Os anticorpos vacinais podem ser detectados até os 18 meses de idade (COSTA et al., 1999), mas passados alguns anos da vacinação ainda não é conhecido qual o período máximo de excreção da B19.

A persistência e flutuação de títulos séricos estão relacionadas com a capacidade de o animal vacinado eliminar o microorganismo vacinal. Estudos bacteriológicos realizados em instalações livres de brucelose revelam que a persistência dos títulos de anticorpos se deve a re-infecção pela estirpe B19. Variações de títulos de anticorpos sem causa aparente também podem ocorrer, porém sem alcançar a magnitude suficiente para interferir no diagnóstico sorológico. Sobre este fenômeno, é sustentada a hipótese de que fatores estressantes, devido às práticas de manejo inadequadas sejam a razão da ocorrência de tal flutuação (ORNELA SANTOS et al., 1975).

A detecção do agente infeccioso é a prova decisiva de diagnóstico sobre os métodos sorológicos, entretanto no estudo realizado não foi isolada *Brucella* spp e B19 nas amostras de leite e urina analisadas.

De acordo com as propriedades biológicas da *B. abortus*, os métodos de cultivo são demorados, podendo falhar quando a concentração bacteriana é baixa (GALLIEN et al., 1998; MERTZ et al., 2003). Além disso, o isolamento pode ficar comprometido pela contaminação por outros microrganismos que competem na utilização dos nutrientes em função da rápida multiplicação em relação a crescimento fastidioso das brucelas (CORTEZ et al., 2001). Além disto, produtos tóxicos resultantes do metabolismo desses contaminantes e alteração do pH podem ser impedientes ao crescimento de brucelas (CARTER; CHENGAPPA, 1994).

Merece ser mencionado, que uma das causas de falha no isolamento de B19 foi à impossibilidade de processamento das amostras logo após a colheita, sendo congeladas até o momento de análise laboratorial, inviabilizando a sobrevivência da bactéria. Sendo assim, a viabilidade ou infectividade do agente não pôde ser

constatada devido à ausência de isolamento de *Brucella* spp. e B19 nas amostras realizadas.

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) vem sendo utilizada com vantagens na detecção de vários agentes nos diferentes materiais clínicos de origem animal, por ser uma técnica sensível, específica e rápida. Está particularmente indicada na detecção de agentes cuja viabilidade é bastante fugaz, permitindo o diagnóstico em amostras deterioradas ou contaminadas e principalmente no monitoramento de excreção de agentes infecciosos.

Um número expressivo 86/420 (20,5%) de DNA de *B. abortus* foi observado ao longo do monitoramento dos animais (Tabela 1), todos identificados como estirpe B19 por “primers” específicos, colocando em alerta a capacidade de persistência dessa estirpe vacinal no organismo animal. A excreção intermitente da B19 pela urina e pelo leite durante um ciclo reprodutivo completo, com persistência de até nove anos, confirma a multiplicação das brucelas no organismo de fêmeas bovinas que haviam sido vacinadas entre três a oito meses e leva a crer que pode ser continuada por toda a vida do animal. Destaque para a excreção urinária 74/210 (35,2%) superior ao leite 12/210 (5,7%), o que de certa forma parece ser menos explorado nas investigações de focos de brucelose e que poderia ser espécime de escolha na investigação da excreção de *B. abortus* em rebanhos leiteiros (Tabela 3).

Ainda que não estejam totalmente esclarecidos para quais locais a estirpe B19 apresenta tropismo, Stevens et al. (1994) observaram, ao infectar experimentalmente camundongos com 0,2 mL de suspensão 10^7 UFC de B19, que a mesma poderia ser recuperada do baço entre duas a doze semanas pós-infecção, caindo drasticamente após esse período. Em 20 semanas, nenhuma bactéria foi recuperada pelo cultivo e pelos testes imuno-histoquímicos não foram detectados antígenos bacterianos no baço. Baseado nesses dados podemos concluir que são as células vivas e não os antígenos bacterianos provenientes de bactérias mortas, quem determinam e mantêm a estimulação da resposta imune na infecção por B19 em camundongos.

Uma vez que no presente estudo foi detectado DNA da bactéria através da PCR em amostras de leite e urina, em animais de até nove anos de idade, entende-se que em algum sítio do organismo animal a estirpe B19 manteve-se viável e capaz

de se multiplicar, podendo estar localizada além do baço, nos linfonodos supramamários e úbere; nos rins ou qualquer outro órgão ainda não investigado.

Desta forma, pode-se inferir que a concentração de brucela B19 circulante seja tão pequena e/ou localizada em sítios protegidos, que não induz resposta imune suficiente ao longo da vida do animal vacinado para ser revelada pelos testes sorológicos usuais. Assim, pode-se também lançar a hipótese de que tal concentração seja insuficiente para ser detectada pelo cultivo bacteriológico, como foi verificado neste trabalho. Os resultados encontrados concordam com os achados de Manthei (1952) e Meyer; Nelson (1969) que detectaram por curto período tempo a persistência da infecção por B19 pelo cultivo.

Embora o mecanismo de infecção da B19 seja semelhante ao da *B. abortus*, não está totalmente esclarecido quais substâncias favorecem a sua multiplicação no organismo hospedeiro. A B19 é deletada do gene *ery*, o que a faz incapaz de sobreviver na presença do eritritol, um poliálcool encontrado no útero gravídico com pico em 150 dias de gestação e depois se mantendo estável (SAMARTINO et al., 1996), ou seja, antes do meio e no final da gestação. Ao contrário da *B. abortus* estirpe de campo, onde o eritritol tem efeito promotor de multiplicação, na B19 seu papel é inibidor (PAULIN, 2006b). Como pode ser observada nas tabelas 1 e 2, a excreção de B19 ocorreu predominantemente até 150 dias da gestação e no pós-parto imediato (30 dias); período em que o eritritol encontra-se em maior concentração (KEPPIE et. al., 1964). Uma vez que a B19 é particularmente sensível à elevada concentração de eritritol, esta estirpe desaparece da circulação neste período, retornando a circular no organismo animal após o parto.

Algumas estirpes de B19 podem ser tolerantes ao eritritol e segundo Bishop *et al.*, 1994; Sangari et al. (1998), esta seja uma das causas do desenvolvimento de infecção persistente. Entretanto, observando a tabela 1, raras foram as excreções observadas após 150 dias de gestação até o parto, o que sustenta a hipótese de que a infecção persistente esteja diretamente relacionada com o sítio de multiplicação da estirpe B19 no organismo do animal do que a possibilidade de algumas estirpes vacinais serem tolerantes ao eritritol.

Se outras substâncias atuam de forma a potencializar a multiplicação das brucelas, tais como hormônios esteróides, sobretudo o estradiol, visto que a grande maioria dos abortamentos por brucelose ocorre nos últimos meses de gestação

neste experimento este fato não foi verificado. Concentrações de estradiol 17β aumentam consideravelmente durante a última semana de gestação nas vacas, enquanto as concentrações de progesterona diminuem sutilmente no mesmo período, decrescendo abruptamente no parto. Neste momento, inicia-se o aumento na produção de estrogênio atingindo o pico na ovulação (SENGER, 1997). Na hipótese do estrogênio estimular a multiplicação da B19, a maior frequência de excreção deveria estar limitada ao período do cio até 40 dias de gestação e após o parto. No entanto, observou-se que a frequência de excreção independeu do período hormonal, ocorrendo intermitentemente do cio (fase estrogênica) até 150 dias de gestação (fase progesterônica) e no pós-parto (fase estrogênica); não havendo diferença entre os três grupos e, portanto sem qualquer relação com a idade atual do animal e sua ciclicidade (Tabela 2).

Uma das principais razões para a utilização de prostaglandina - $\text{PGF}_{2\alpha}$ (CIOSIN[®]) é a promoção da sincronização de cio e otimização da inseminação artificial, permitindo a escolha da melhor época do ano para o parto, normalmente quando há maior oferta de alimento. $\text{PGF}_{2\alpha}$ induz a regressão do corpo lúteo pela luteólise, fazendo com que os animais retornem ao cio a partir do segundo dia da aplicação, mas seu uso está limitado a fêmeas bovinas que apresentam ciclo estral regular e corpo lúteo funcional. Estas condições eram encontradas entre os animais da Fazenda Palmeira, aonde o protocolo de sincronização de cio vinha sendo empregado. Todos os animais encontravam-se nas mesmas condições hormonais durante as colheitas iniciais de soro, o que explica não haver diferença significativa entre os valores medianos de estrogênio entre G1, G2 e G3. Portanto a excreção de B19 foi independente da faixa etária dos animais.

Diante dos resultados, fica clara a excreção da estirpe B19 por longos períodos.

O impacto da B19 no meio ambiente, sua possibilidade de transmissão entre bovinos, principalmente para machos, ou mesmo outras espécies animais, comunicantes e suscetíveis incluindo o homem, carece de estudos. Miyashiro (2004) revelou que em 192 amostras de queijo de origem clandestina, 37 apresentavam DNA para *Brucella* spp pela PCR multiplex, sendo 30 para B19; alertando para o risco potencial à saúde pública.

Além dos cuidados devidos com a manipulação da B19 no campo, por se tratar de uma vacina viva e virulenta para o homem, deve-se atentar para o papel zoonótico no manejo dos animais excretores.

6 CONCLUSÕES

- O rebanho da fazenda Palmeira mostrou-se livre de brucelose, mantendo-se sorologicamente negativo durante todo período experimental e, portanto adequado para os objetivos deste trabalho.
- O emprego de PCR-multiplex permitiu a diferenciação entre estirpe vacinal B19 e *Brucella* spp. sendo todas as 86 amostras positivas identificadas como provenientes da vacinação com B19.
- Constatou-se durante o monitoramento de um ciclo reprodutivo completo, ou seja, do cio ao pós-parto imediato, a excreção intermitente de *B. abortus* estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias que haviam sido vacinadas contra brucelose na idade de três a oito meses.
- A excreção pela urina foi significativamente ($p=0,012$) mais freqüente do que pelo leite.
- A excreção da estirpe vacinal B19 ocorreu predominantemente do momento do cio aos 150 dias de gestação e no pós-parto imediato (30 dias), ou seja, independentemente da fase hormonal do ciclo reprodutivo, de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias que haviam sido vacinadas contra brucelose na idade de três a oito meses.
- A persistência e excreção de B19 foi observada em fêmeas bovinas de até nove anos de idade, que haviam sido vacinadas contra brucelose na idade de três a oito meses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. BRUCELOSIS. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 06-24.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. BRUCELOSIS. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. I: bacteriosis y micosis**. 3 ed Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001, p. 28-56 (Publicación Científica, 580).
- ADAMS, L. G. Development of life Brucella vaccines. In: ADAMS, L. G. (Ed). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A & M University Press, College Station, 1990. p. 251-276.
- AGUIRRE, N. P.; VANZINIV. R., et al.: Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **Journal Immunoassay Immunochem**, v. 23, n. 4, p. 471-8, 2002
- ALTON, G. G.; CORNER, L. A.; PLACKETT, P. Vaccination of pregnant cows with low doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 269-272, 1980.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545 p.
- BAETZ, A. L.; BARNETT, D.; BRYNER, J. H.; CYSEWSKI, S. J. Plasma progesterone concentration in the bovine before abortion or parturition in pregnant animals exposed to *Sarcocystis cruzi*, *Campylobacter fetus* or *Aspergillus fumigatus*. **American Journal Veterinary Research**. v. 41, p. 1767-1768, 1980.
- BAETZ, A. L.; LEITING, S. E.; BRYNER, J. H.; BARNETT, D. Parturition changes of plasma concentrations of prostaglandin F and 13,14-dihydro-15-ketoprostaglandin metabolites in pregnant animals exposed to *Sarcocystis cruzi* or *Campylobacter fetus*. **American Journal Veterinary Research**. v.42, p. 22-24, 1981.
- BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. W.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p 271-275, 1992.
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose**. São Paulo: Roca, v.2, p. 144-160, 1988.
- BECKETT, F.W. e McDIARMID, S.C. In: The effect of reduced dose *Brucella abortus* strain 19 vaccination in accredited dairy herds. **British Veterinary Journal**, p. 141-507, 1985.

BEDFORD, C. A.; HARRISON, F. A.; HEAP, R. B. The metabolic clearance rate and production rate of progesterone and the conversion of progesterone to 20-hydroxypregn-4-en-3-one in the sheep. **The Journal of Endocrinology**, v. 55, n. 1, p. 105-118, 1972.

BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos**: doenças causadas por vírus, infecções por clamídias, rickettsiose, micoplasmose, São Paulo: Roca, v. 2, p. 144-160, 1988.

BERAN, G. W. **Handbook of zoonosis**. 2 ed. CRC press p.23-24, 1994.

BISHOP, G. C.; BOSMAN, P. P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J. A. N.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of Livestock**, Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1994. v. 2, p. 1053-1066.

BRANDON, M. R.; WATSON, D.C.; LASCELLES, A. K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 49, p. 613-623, 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). Planos e Programas. Programas. Área Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCBT)**. Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 6, de oito de janeiro de 2004. Regulamento PNCEBT. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12 fev. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (MAPA). Planos e Programas. Programas. Área Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCBT). Instrução Normativa do Serviço Nacional Animal número 2, de dez de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2007.

BRICKER, B. J.; HALLING, S. M. Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1640-1642, 1995.

BRICKER, B. J.; PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n.1-4, p. 435-436, 2002.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. Brucella. In: CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. (Ed.). **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4. ed. Philadelphia: London, 1991. p. 196-201.

CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. Boletín do Centro Panamericano de Zoonosis. **Oficina Sanitaria Panamericana, Organización Mundial de La Salud**, v. 18, n. 3/4, p. 107-139, 1976.

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

CHEVILLE, N. F.; STEVENS, M. G.; JENSEN, A. E.; TATUM, F. M.; HALLING, S. M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1591-1597, 1993.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532-537, 1993.

COMERCI, D. J.; POLLEVICK G. D.; VIGLIOCCO, A. M.; FRASCH, A. C.; UGALDE R. A. Vector development for the expression of foreign proteins in vaccine strain *Brucella abortus* S19. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3862-3866, 1998.

CONFER, A. W. et al. In: Effects of challenge dose on the clinical and immune responses of cattle vaccinated with reduced doses of *Brucella abortus* strain 19. **Veterinary Microbiology**, 10(1985) p.561-575.

CORBEL, M. J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., Jerusalem. **Proceedings...** 1997, v. 3, n. 2, p. 213-221.

CORREA, W. M; CORREA, C. N. M. **Brucelose: enfermidade infecciosa dos mamíferos domésticos**, 1979.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R. M.; HEINEMANN, M. B.; SAKAMOTO, S. M.; GENOVEZ, M. E.; FERREIRA, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p. 500-501, 2001.

COSTA, G.M., ABREU, V.L.V., LOBATO, F.C.F., SILVA, J.A.; MARTINS, N.E. Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo "O" no diagnóstico da brucelose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 51, n. 4, p.317-322, 1999.

DE GARCIA, A. S. **Deteção de DNA de *Brucella abortus* em amostras de leite bovino experimentalmente contaminado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 1997. 37 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada A Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; JÚNIOR ARCARO, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo, **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 25-33, 2003.

DOBSON, H.; ROWAN, T.G.; KIPPAX, I.S.; HUMBLLOT, P. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. **Theriogenology** v.40, p. 411-425, 1993.

ERDENEBAATAR, J. et al. In: Serological differentiation of *Brucella* – vaccinated and –infected domesticated animals by the agar gel immunodiffusion test using *Brucella* polysaccharide. **Mongolia Journal Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 9, p. 839-841, 2002.

EWALT, D. R.; BRICKER, B. Validation of the abbreviated *brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3085-86, 2000.

FEKETE, A.; BANTLET, J. A.; HALLING, S. M. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. **Journal of Veterinary Investigation**, v. 4, p. 79-83, 1992.

FERNANDES, C. A. C. Neuroendocrinologia da reprodução. In:-----**Fisiopatologia e Biotecnologia da Reprodução Animal**, Alfenas, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Alfenas, 2000, p. 20– 5.

FERRAZ, I. B. F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 4, p.504-508, 1999.

GALINDO, A. S. D. **Avaliação uterina de vacas repetidoras de cio: citologia, histologia, microbiologia e teor de proteínas totais**. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2002.

GALLIEN, P.; DORN, C.; ALBAN, G.; STAAL, C; PROTZ, D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Veterinary Record**, v.142, p 512-14, 1998.

GARCIA-CARRILLO, C. In: Situação atual e perspectivas do emprego de imunógenos no controle da brucelose. **Comunicações científicas** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, v.9, p 201-203, 1984.

GARCÍA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the Americas**. Paris: Office Internationale Epizootique, 1990. 299 p.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal Veterinarian Research Animal Science**, v. 30, n.2, pp. 107-12, 1993.

GEONG, M.; ROBERTSON, I.D. Response of bali cattle (*Bos javanicus*) to vaccination with *Brucella abortus* strain 19 in West Timor **Preventive Veterinary Medicine**, n.47, p 177-86, 2000.

GRANNER, D.K. **Hormônios da córtex adrenal**. In: HAPPER: Bioquímica, p.531-549, cap.49, 7ª ed, 1994

GREGORY, S. L. Symposium: health problems of the postpartum cow – uterine health and disorders. **Journal Dairy Science**, n. 80; p. 984-994, 1997.

HERR, S.; ROUX, D. The isolation of *Brucella abortus* biotype 1 from serologically positive reactors following on S19 adult inoculation of dairy cows. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 51, n. 4, p. 255 - 257, 1980.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed Baltimore: Williams & Wilkins, 789 p., 1994.

HUNTER, D.; ALLEN, J. Na evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. **The Veterinary Record**, v.91,p.310 -312, 1972.

HUSSAIN, A M.; DANIEL, R .C. Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows normal and abnormal parturition. **Theriogenology**, v. 32, p. 1253-67, 1992.

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A. E.; WITT, K.; SMITH, H. The role of erythritol in the tissue localization of the brucellae. **Brazilian Journal Experimental Pathology**, v. 46, p. 104-108, 1964.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; GUSTAFSSON, H. The cow in endocrine focus before and after calving. **Reproduction in Domestic Animals** v. 39, p. 217-221, 2004.

KRUZE, M. V. Métodos de diagnostico en el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 7, n. 2, p. 52-64, 1975.

LEAL-KLEVEZAS, D. S.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, I. O.; LÓPEZ-MÉRINO, A.; MARTÍNEZ-SORIANO, I.P. In: Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, pp 3087-3090, 1995.

MANTHEI, C. A., In: Evaluation of vaccinal methods and doses of *Brucella abortus* strain 19, Procciding 56th **Annu. Meet Livestock Saint. Assoc.**, 1952, 115.

MATAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDELNIOOR, A. M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA **Journal of Clinical Microbiology**, p 477-478, 1996.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; CHEN, A. A.; GIRIO, R. J. S.; NETO, W. V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação do complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21(4), p.139-142; 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*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3-4, p. 111-114, 1998.
- MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. **Veterinary Pathology**, v. 26, p. 513-515, 1989.
- MEGID, J; RIBEIRO, M.G; AGOTTANI, J.V.B; MARCOS, G.Jr. Imunodifusão em gel de ágar com polissacarídeos de membrana de *Brucella abortus* B19 no diagnóstico da brucelose bovina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.51, n. 5, p. 433-437, 1999.
- MERTZ, A.; OZARAS, R.; TABAK, F.; BILIR, M.; YILMAZ, M.; KURT, C.; ONGOREN, S.; TANRIVERDI, M.; OZTURK, R. The sensivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.4, p.241-243, 2003.
- METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. In: BERAN, G. W.; STEELE, J. H. (Ed.). **Handbook series in zoonosis. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.
- MEYER, M.E. Metabolic characterization of the genus *Brucella*. VI. Growth stimulation by i-erythritol compared with strain virulence for guinea pigs. **Journal of Bacteriology**, v. 93, p. 996-1000, 1967.
- MEYER, M. E.; NELSON, C.J., Persistence of *Brucella abortus*, strain 19 infection in immunized cattle, Procciding 73rd **Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.**, 159, 1969.
- MINGLE, C.K., MANTHEI, C.A.; JASMIN, A.M., The stability of reduced virulence exhibited by *Brucella abortus* strain 19, **Journal American Veterinary Medicine Association**, 99, 203, 1941.
- MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID, L. B.; DIAS, R. A.; GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR), **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 17-22, 2007.
- NICOLETTI, P. Further evaluation of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, p. 1811-1816, 1969.
- NICOLETTI, P. **Vaccination** In: Animal Brucellosis, C. 11, p 283-99, 1990.
- NICOLETTI, P. Vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain 19 administered by differing routes and doses. **Vaccine** v. 2, p. 133-135, 1984.
- NICOLETTI, P. JONES, L.M.; BERMAN, D.T. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in a dairy herd infected with

brucellosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 2, p. 1445-1449, 1978.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archives of Medicine Veterinary**, v. 28, p. 9-17, 1995.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J, R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990.453p.

NIELSEN, K. AND DUNCAN, J, R. In: **Antibody Isotype Response in Adult Cattle Vaccinated with *Brucella abortus* S19**. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 19, p. 205-214, 1998.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité Mixto FAO/ OMS de expertos en brucelosis**. Ginebra, OMS, 1986, 149 p.(Série de informes técnicos 740).

OIE. Organização Internacional de Epizootia. **Bovine brucellosis**. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health Code 2005, Part 2, Section 2.3, carpter 2.3.1 Disponível em: <http://www.oie.int.html>. Acesso em: 2006.

ORNELA SANTOS, P. P; ARAUJO, R. F; REIS, R; MOREIRA, E. C; FIQUEIREDO, J. B; VIANA, F. C; BARROS, D. G; JARDIM, O. M. Brucelose bovina.I. Persistência da aglutinação pós-vacinal em bezerras de raças zebuínas vacinadas com amostra B19. **Arq. Esc. Vet. U.F.M.G.**, 27 (3): 363-373, 1975.

PAHO/WHO - Pan American Health Organization / World Health Organization **Brucellosis PAHO/WHO Experts Consultation Meeting on Vaccines and Vaccination Strategies**, 1999.

PARMA, A. E., SANTISTEBAN, C. G.; BOWDEN, R. A. Detection in bovine serum of non-agglutinating antibodies disease against occult antigens of *Brucella abortus* strain 19 .**Revista Argentina de Microbiologia**.1985; 17(1): 51-4.

PATEL, O.V.; HIRAKO, M.; TAKAHASHI, T.; SASAKI, N.; DOMEKI, I. Sex steroid levels throughout gestation in cows carrying normal and malformed fetuses. **Journal Veterinary Medicine Science**. v. 57, p.659-663, 1995.

PAULIN, L. M. S. Brucelosis en animales de américa del sur.estrategias de control. In: CACCHIONE, R.A.; DURLACH, R.; LARGHI, O. P.; MARTINO, P. (Ed.). **Temas de zoonosis**. 1. ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2006 a., cap 13, p. 130-140.

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

PAULIN, L.M.S. **O combate à brucelose bovina.** Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

PAYNE, J. M. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 78, p. 447-463, 1959.

PEARCE, J. H.; WILLIAMS, A. E.; HARRIS-SMITH, P. W.; FITZGEORGE, R. B.; SMITH, H. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. II. Erythritol, a constituent of bovine foetal fluids which stimulates the growth of *B. abortus* in bovine phagocytes. **British Journal Experimental Pathology**, v.43, p.31-37, 1961.

PIRES, M. F. A. Ambiência na produção de leite. Anais Simpósio sobre Manejo, Nutrição e Sanidade de Gado de Leite, 2001, São Carlos, SP. **Anais...** p.251 - 283.

PLOMMET, M.; FENSTERBANK, R. Vaccination against bovine brucellosis with a low dose of strain 19 administered by the conjunctival route. III. Serological responses and immunity in the pregnant cow. **Annals of veterinary research**.7 (1): 9-23, 1976.

POESTER, F. P.; RAMOS, E. T.; GOMES M. J. P., Chiminazzo C.; Schurig G. 2000. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51.Braz. **Journal Veterinarian Research Animal Science** v.37, n. 1. Disponível em: www.scielo.br. Acesso em: 2007.

QUEIPO-ORTUÑO, M. O; MORATA, P; OCÓN, P; MANCHADO, P; DIOGOS COMEVARO, J. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, p 2927-2930, 1997.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe publishing, 1994, 648p.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI In: **Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of Brucella spp. by PCR**. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n.8, p 3735-37, 1999.

ROMERO, C.; PARDO, M.; GRILLO, M.J.; DIAZ, R.; BLASCO, J.M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3198-3200, 1995 b.

ROMERO, L.; GAMAZO, C.; PARDO, M.; LÓPEZ-GOÑI, I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p 615-617, 1995 a.

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

SAMARTINO, L. E.; TRAUX, R. E.; ENRIGHT, F. M. Invasion and replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. **Zentralbl Veterinarmed B.** v.41, n. 4, p. 229-36, 1994.

SAMARTINO, L., GREGORET, R., GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **J. Immunoassay.** v.20, n.3, p. 115-126, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 1 ed., New York, Cold Spring Harbor Press, 1989, 957 p.

SANGARI, F. J. ; AGÜERO, J., GARCIA-LOBO, J. M. Improvement of the *Brucella abortus* B19 vaccine by its preparation in a glycerol based medium. **Vaccine**, v. 14, n. 4, p. 274-276, 1996.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J. M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**, v. 146, p. 487-95, 2000.

SANGARI, F. J.; GARCÍA-LOBO, J. M.; AGÜERO, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 121, p. 337-342, 1994.

SANGARI, F.J.; GRILLÓ, M.J.; BAGUÉS, M.P.I.; GONZÁLEZ-CARRERÓ, M.I.; GARCIA-LOBO, J.M.; BLASCO, J.M.; AGÜERO, J. In: The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strains is unrelated with its attenuated virulence in mice. **Vaccine**, v. 16, n. 17, p. 1640-45, 1998.

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

SENGER, P.L. Placentation the endocrinology of gestation and parturition. In: **Pathways to Pregnancy and Parturition**, Washington, 1999. 1 ed., p. 232-247.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science.** v. 82-83, p.295-306, 2004.

SMITH, H., KEPPIE, J.; PEARCE, H.; FULLER, R.; WILLIAMS, A. E. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. In: Isolation of *Brucella abortus* from bovine foetal tissue. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 42, p. 631-637, 1961.

SPERRY, J. F.; ROBERTSON, D. C. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. **Journal of Bacteriology**, v. 121, p. 619-630, 1975.

STEVENS, M. G.; OLSEN, S. C.; CHEVILLE, N. F. In: Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, p. 223-235, 1995.

SUTHERLAND, S. S.; ROBERTSON, A. G.; LE CRAS, D. V.; ROBERTSON, G. M.; JOHNSTON, J. M., EVANS, R. J. The effect of challenge with virulent *Brucella abortus* on beef cattle vaccinated as calves or adults with either *Brucella abortus* strain 19 or 45/20. **Australian Veterinary Journal**, v.57, 1981.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. The genus *Brucella*. In: TYMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. (Ed.). **Hagan and bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates, 1988. p. 135-152.

TIZARD, I.R. **Vacinação e vacinas** In: Imunologia Veterinária - uma introdução. cap. 21, p 273-293, 1996

TRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworth, 1986. 273 p.

USDA. UNITED STATES DEPARTAMENTO DE AGRICULTURE. Animal and Plant Health Inspection Service. Animal Health. Veterinary Services. Disease Eradication. National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis. Facts about brucellosis**. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov> . Acesso em:2006.

VIANA, F.C; VILLELA, L.G; SILVA J. A; MENDES, J. E; MOREIRA, E.C; DIAS, T.D. Vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida da vacina (amostra 19) por via conjuntival. **Arquivos da Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais**, v.34, p. 279-287, 1892.

VIZCAÍNO, N.; CLOECKAERT , A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; FERNÁNDEZ-LAGO, L. DNA polymorphism in the genus *Brucella* . **Microbes and Infection**, v.2, p. 1089-1100, 2000.

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

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1999. 663 p.

ZHANG, W. C.; NAKAO, T.; MORIYOSHI, M.; NAKADA, K.; RIBADU, A. Y.; OHTAKI, T.; TANAKA, Y. Relationship of maternal plasma progesterone and estrone sulfate to dystocia in Holstein-Friesian heifers and cows. **Journal Veterinary Medicine Science**. v. 61, p.909-913.

ANEXO A

Segundo FERNANDES, 2000:

- Pró-estro: nos ovários ocorre a regressão do corpo lúteo, desenvolvimento dos folículos de Graaf e ocorre aumento dos níveis de estrógeno.
- Estro / cio: aumento dos níveis de estrógeno e de hormônio folículo estimulante (FSH), queda da produção de leite, diminuição de apetite, acúmulo de muco, intensa hiperemia da mucosa, nas primeiras horas ocorre pico de hormônio luteinizante (LH) (provocando a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo), ocorre entre o 7° - 9° dia do ciclo estral.
- Pós-estro: ocorre à ovulação, crescimento do corpo lúteo, diminuição do muco vaginal (pode ser sanguinolento em novilhas devido à ruptura de pequenos capilares em consequência do aumento dos níveis de estrógeno).
- Interestro / diestro: repouso sexual, progesterona começa a ser produzida pelo corpo lúteo, ocorre aumento dos níveis de LH no plasma e leite, corpo lúteo com maturação completa em torno do 8° - 12° (dia), no 18° dia ocorrerá concepção ou regressão do corpo lúteo devido a progesterona secretada no endométrio, diminuição da produção de muco (este quando presente apresenta baixa viscosidade).

O nível plasmático de progesterona aumenta a partir do 3º dia do ciclo estral, permanecendo elevado até o 17º dia. Caso não ocorra concepção, 2-3 dias antes do início do novo cio este teor cai bruscamente.