

RUI DE ALMEIDA SILVA JÚNIOR

**Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina
(*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19**

São Paulo
2013

RUI DE ALMEIDA SILVA JÚNIOR

Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Lara Borges Keid

São Paulo
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2809
FMVZ

Silva Júnior., Rui de Almeida

Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19 / Rui de Almeida Silva Júnior. -- 2013.

84 f. : il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Lara Borges Keid.

1. Brucelose. 2. Búfalos. 3. Vacina B19. 4. Avaliação sorológica. 5. PCR.
I. Título.

*Comissão de Ética no uso de animais*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19", protocolado sob o nº 2621/2012, utilizando 56 (cinquenta e seis) búfalos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lara Borges Keid, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Evaluation of the serological and microbiological profile of female buffaloes (*Bubalus bubalis*) vaccinated against brucellosis with the B19 vaccine", protocol number 2621/2012, utilizing 56 (fifty-six) buffaloes, under the responsibility Profa. Dra. Lara Borges Keid, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA JÚNIOR, Rui de Almeida

Título: **Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19**

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Rui e Tereza, por todo amor, dedicação, exemplo, incentivo e apoio que compartilham comigo desde sempre. Vocês são o meu porto seguro.

Aos meus irmãos, Helena e Ataliba. Que nosso amor e amizade nos mantenha sempre unidos;

À minha amada Vó Melinha (In memoriam) por todo amor, carinho e bondade que eternamente irão tocar minha mente e meu coração;

Ao meu amor, Hava. Por todo amor, carinho e companherismo que fazem de mim uma pessoa mais feliz;

Traduzir em palavras o amor que sinto por vocês e tudo que representam em minha vida não é fácil. Por isso, singelamente digo, amo vocês!

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Lara Borges Keid, pela confiança em meu trabalho, pelo conhecimento compartilhado e por ser um dos pilares do meu desenvolvimento profissional. Tenho por você grande admiração e respeito;

Ao meu co-orientador, Prof. Rodrigo Martins Soares, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e pelo auxílio em todas as etapas desse projeto. Tenho por você grande admiração e respeito;

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por terem sido fundamentais no meu desenvolvimento profissional;

Ao Dr. Otavio Bernardes, por ter permitido a utilização dos seus animais em meu experimento e por todo conhecimento compartilhado em nossas conversas;

A Divisão de Produção Agropecuária da Prefeitura do Campus USP de Pirassununga por ter permitido a utilização dos animais em meu experimento;

A Dra. Lília Paulin, pela orientação e auxílio na realização dos testes sorológicos e por todo conhecimento compartilhado

Aos amigos do VPS Pirassununga, João Metzner, Ni, Seu Antônio e Ceíça, pela amizade construída, pelos bons momentos de convivência e pelo auxílio durante as colheitas e análises das amostras;

Aos funcionários do setor de bubalinocultura da Prefeitura do Campus USP de Pirassununga, Cuel e Pavão, por todo auxílio durante as colheitas das amostras;

Ao Sr. Osmar Bernades e aos funcionários da fazenda Paineiras da Ingaí pelo auxílio no agendamento das visitas e no manejo dos animais para que as colheitas pudessem ser realizadas;

Aos amigos do VPS Júlia Benassi, Jaqueline Diniz, Mayra Rocca, Daniela Chiebao, Fernanda Koga, Vanessa Figueredo, Graziela Benvenga, Samantha Valadas, João Gaúcho, Nathália Lopez, William Cañón por todo auxílio na execução desse projeto e pelos bons momentos de convivência;

As Professoras Trícia Maria Oliveira e Ana Maria Martins por terem me orientado no programa PAE;

As pesquisadoras e funcionárias do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico pelo conhecimento e bons momentos compartilhados;

Aos secretários do VPS, Danival, Cris e Virgínia;

Aos funcionários e amigos do VPS São Paulo;

Aos funcionários da Assistência Administrativa de Pirassununga, Marcão, Paula e Alex;

Aos motoristas e funcionários do setor de transportes, em especial ao Reinaldo e ao Valmir que me auxiliaram nas colheitas;

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FMVZ;

A Elza, Helena, Rosângela, Neusa e demais funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'ápice da FMVZ/USP;

A todos funcionários da FMVZ, FZEA e Prefeitura do Campus USP de Pirassununga;

A CAPES, por ter me concedido a bolsa de mestrado;

E um especial agradecimento:

Aos meus sogros Maria Aparecida e Celso Nardi por sempre me acolherem com amor e carinho em sua casa;

Aos meus grande amigos, Bati, Bada, Maku, Xacrete, Breuba e Gordinho por serem meus irmãos de coração;

Aos amigos de pós-graduação do VPS, VRA e VNP pelos bons momentos de convivência;

As búfalas, animais magníficos e encantadores, que foram um dos pilares para a realização desse trabalho;

O meu eterno agradecimento a cada um de vocês que, de alguma forma, fizeram parte na realização desse trabalho. Muito obrigado!

*Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

SILVA JÚNIOR, R. A. **Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19.** [Evaluation of microbiological and serological profile of female buffalo calves (*Bubalus bubalis*) vaccinated against brucellosis with B19 strain vaccine]. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A ferramenta mais importante para o controle da brucelose em bubalinos e bovinos é a vacinação compulsória, utilizando-se a vacina viva atenuada contendo a estirpe B19 de *Brucella abortus*. A vacina B19 confere imunidade duradoura à infecção nos animais vacinados, e sua aplicação é restrita às fêmeas com idade entre 3 e 8 meses. A vacina B19 induz a produção de anticorpos que interferem no sorodiagnóstico da infecção, de forma que o diagnóstico sorológico de animais vacinados deve ser realizado apenas após os 24 meses de idade, idade na qual os anticorpos de origem vacinal já declinaram para níveis não detectáveis. O desempenho, a cinética humoral e o período de clearance da estirpe vacinal são bem conhecidos nos bovinos, contudo há poucas informações referentes a estes aspectos na espécie bubalina. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eliminação da estirpe B19 pelas fêmeas bubalinas vacinadas com a dose padrão contendo de 60 a 120 bilhões de UFC, assim como o perfil da resposta imune humoral induzido pela vacinação e a eficiência dos principais testes laboratoriais em diferenciar anticorpos vacinais dos anticorpos induzidos pela infecção natural. Foram utilizadas 44 fêmeas bubalinas provenientes de duas propriedades, negativas para brucelose, localizadas no interior do Estado de São Paulo, sendo 33 animais da propriedade A e 11 da propriedade B. Os animais foram vacinados e amostras de sangue, *swab* vaginal e urina foram coletas semanalmente, desde o dia em que a vacinação foi realizada (D0) até que os animais completassem 24 meses de idade. Os soros obtidos a partir das amostras de sangue foram utilizados na avaliação sorológica, empregando-se os seguintes testes: antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2ME), fixação de complemento (FC) e polarização fluorescente (PF). As amostras de urina e *swab* vaginal foram submetidas ao cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella* spp. e à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para avaliar a eliminação da estirpe vacinal. Na PCR, as amostras foram amplificadas primeiramente utilizando-se primers direcionados à região interespaçadora do RNA ribossomal de *Brucella* spp. (PCR-ITS) para a detecção de qualquer componente do gênero. Amostras com

resultados positivos pela PCR-ITS foram submetidas à PCR utilizando-se *primers* direcionados ao gene *eri* de *Brucella* spp, num ensaio específico para a detecção da estirpe B19 (PCR-B19). Foi calculada a especificidade de cada teste sorológico em detectar como negativos os animais vacinados. Todos os animais apresentaram-se reagentes aos sete dias pós-vacinação no teste de AAT, aos 14 dias no teste de 2ME, aos 126 no teste de FC. No teste de PF, o D28 foi o período em que o maior número de animais apresentaram resultados positivos. Dezesesseis animais não soroconverteram em nenhum momento do experimento pelo teste de PF. A PF foi o teste mais eficiente na diferenciação de anticorpos vacinais, sendo que todos os animais apresentaram resultados negativos aos 151 e 232 dias pós-vacinais nas propriedades A e B, respectivamente. No teste de FC, 100% animais apresentaram resultados negativos no D552 (propriedade A) e no D331 (propriedade B). No D552 na propriedade A as especificidades foram de 92,31% para o teste de 2ME e 69,23% para o teste de AAT. A propriedade B apresentou nos dias D366 especificidades de 72,73% e 36,36% para os testes 2ME e AAT, respectivamente. Todos os animais foram negativos pelo cultivo microbiológico em todo o período de monitoramento. Na PCR foram verificadas 19 das 1144 amostras positivas (1,66%). Das 44 bezerras avaliadas, 15 (34,1%) apresentou resultado positivo em pelo menos uma colheita, em amostras de urina e/ou swab vaginal. De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a prova sorológica mais eficiente para a diferenciação dos anticorpos de origem vacinal dos da infecção natural é o teste de PF e que, a eliminação da estirpe vacinal pode ocorrer de forma intermitente, durante períodos prolongados nas fêmeas bubalinas vacinadas.

Palavras-chave: Brucelose. Búfalos. Vacina B19. Avaliação sorológica. PCR.

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, R. A. **Evaluation of microbiological and serological profile of female buffalo calves (*Bubalus bubalis*) vaccinated against brucellosis with B19 strain vaccine.** [Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B19]. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The most important tool for the control of brucellosis in buffalo and cattle is compulsory vaccination, using a live and attenuated vaccine containing the S19 strain of *Brucella abortus*. The S19 vaccine confers long-lasting immunity to infection in vaccinated animals and the application is restricted to females aged between 3 and 8 months. The S19 vaccine induces production of antibodies that interfere with serodiagnosis of infection, so that the serological diagnosis of vaccinated animals must be only realized after 24 months of age, when the vacinal antibodies declined to undetectable levels. The performance, kinetics and humoral clearance period of the strain 19 vaccine are well known in cattle, however there is little information concerning these aspects in buffalo. This study aimed to evaluate the elimination of strain S19 by buffalo females vaccinated with the standard dose containing 60-120 billion CFU, as well as the profile of the humoral immune response induced by vaccination and efficiency of principal's laboratory tests to differentiate vaccinal antibodies of the antibodies induced by natural infection. We used 44 female buffalo from two farms negative for brucellosis, located in the State of São Paulo, being 33 animals of the property A and 11 of the property B. The animals were immunized and blood samples, urine and vaginal swabs were collected weekly from the time that vaccination is performed (D0) until complete 24 months of age. The sera obtained from the blood samples were used for serological testing, using the following tests: rose bengal test (RBT), 2-mercaptoethanol (2ME), complement fixation test (CFT) and fluorescence polarization assay (FPA). The urine samples and vaginal swabs were tested by microbiological culture for isolation of *Brucella spp.* and polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the clearance of the vaccine strain. In PCR, the samples were first amplified using primers directed to the interspace region of the ribosomal RNA *Brucella spp.* (ITS-PCR) for the detection of any component of the genus. Samples with positive results by ITS-PCR were subjected to PCR using primers directed to the gene of ery of *Brucella spp.*, in a specific assay for the detection of strain B19 (B19-PCR). Were calculated the specificity of each serological test to detect as negative the vaccinated animals. All animals showed reagents at seven days post-

vaccination in the RBT test, at 14 days in the test 2ME, 126 on the CFT test. In the test of FPA, D28 is the period in which the highest number of animals tested positive. Sixteen animals do not seroconverted at any time of the experiment by FPA. The FPA test was more effective in differentiating antibodies of vaccination, and all animals were negative at 151 and 232 days post vaccination in the properties A and B, respectively. In test CFT, 100% animals showed negative results in D552 (property A) and D331 (property B). In the property A, at D552, the specificities were 92.31% for the test 2ME and 69.23% for the test RBT. Property B had in the days D366 specificities of 72.73% and 36.36% for the tests 2ME and RBT, respectively. All animals were negative by microbiological culture throughout the monitoring period. In the PCR were verified 19 samples positives in 1144 (1.66%). Of the 44 heifers evaluated, 15 (34.1%) showed positive results in at least one sample, in samples of urine and/or vaginal swabs. According to the presented results, we can conclude that the most effective serological test for differentiation of antibodies of natural infection of vaccine testing is FPA and the elimination of the vaccine strain may occur intermittently during periods prolonged in buffalo females vaccinated.

Keywords: Brucellosis. Water buffalo. S19 vaccine. Serological evaluation. PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das bezerras bubalinas conforme a faixa etária, São Paulo – 2013.....	37
Tabela 2 -	Resultados positivos, totalidade dos resultados positivos, especificidade e especificidade total dos quatro testes sorológicos e das PCRs dos animais da propriedade A, divididos em grupos quanto a faixa etária e separados por coleta, São Paulo - 2013.....	50
Tabela 3 -	Resultados positivos, totalidade dos resultados positivos, especificidade e especificidade total dos quatro testes sorológicos e das PCRs dos animais da propriedade B, divididos em grupos quanto a faixa etária e separados por data de colheita, São Paulo - 2013.....	55
Tabela 4 -	Resultados positivos obtidos na PCR das amostras de <i>swab</i> vaginal e urina dos animais das propriedades A e B, São Paulo - 2013.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Seqüência dos primers direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal e do gene ery, empregados respectivamente, para a detecção de Brucella spp. e da estirpe vacinal B19, São Paulo – 2013.....	47
Gráfico 1 -	Dinâmica dos valores de especificidade dos quatro testes sorológicos ao longo do período pós-vacinal da propriedade A, juntamente com identificação pontual dos momentos em que ocorreram eliminações da cepa vacinal, São Paulo - 2013.....	60
Gráfico 2 -	Dinâmica dos valores de especificidade dos quatro testes sorológicos ao longo do período pós-vacinal da propriedade B, juntamente com a identificação pontual dos momentos em que ocorreram eliminações da cepa vacinal, São Paulo - 2013.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2ME = teste do 2-mercaptoetanol
AAT = antígeno acidificado tamponado
dATP = desoxi-adenosina trifosfato
dCTP = desoxi-citosina trifosfato
dGTP = desoxi-guanosina trifosfato
dTTP = desoxi-timidina trifosfato
DNA = ácido desoxirribonucléico
EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA = ensaio imunoenzimático
FC = teste da fixação do complemento
fg = fentograma
g = grama
g = gravidade
H₂S = sulfeto de hidrogênio
HCl = ácido clorídrico
IgG = imunoglobulina G
IgM = imunoglobulina M
ITS = internal transcribed sequence
K = Kappa
KCl = cloreto de potássio
kDa = kilodalton
L = litro
LPS= lipopolissacarídeos
LS = Lumazine Synthase
M = molar (mol por litro)
ME = 2-mercaptoetanol
mg = miligrama
MgCl₂ = cloreto de magnésio
mL = mililitro
mm = milímetro
μM = micromolar
mM = milimolar
μg = micrograma
μL = microlitro
NaCl = Cloreto de sódio
nm = nanômetro
O-LPS = lipopolissacarídeo O
Omp31 = outer membrane protein 31
p/v = peso por volume
bp = base pair (pares de bases)
PCR = reação em cadeia pela polimerase
PF = teste da polarização fluorescente
pg = picograma
pH = potencial hidrogeniônico
RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotações por minuto

SAL = prova de soroaglutinação lenta

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = tris-borato-EDTA

TE = tampão Tris-EDTA

TRIS = Tris (hidroximetil) amino metano

Tris HCl = Tris (hidroximetil) amino metano com ácido clorídrico

Tris-borato = Tris (hidroximetil) amino metano com borato

UI = unidade internacional

UITFC = unidade internacional teste de fixação do complemento

V = volts

X= vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMPORTÂNCIA DA BRUCELOSE EM BOVINOS E BUBALINOS.....	21
1.2 BRUCELOSE COMO ZOOSE.....	22
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA.....	23
1.4 VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA.....	25
1.5 DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM BOVINOS E BUBALINOS.....	27
1.5.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT).....	28
1.5.2 Prova do 2-mercaptoetanol (2ME).....	29
1.5.3 Teste da fixação do complemento (FC).....	30
1.5.4 Teste da polarização fluorescente (PF).....	30
1.5.5 Diagnóstico bacteriológico.....	32
1.5.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	33
2 OBJETIVOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS.....	36
3.2 VACINAÇÃO.....	37
3.3 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	37
3.3.1 Amostras de soro.....	38
3.3.2 Amostras de urina.....	38
3.3.3 Amostras de <i>swab</i> vaginal.....	39
3.4 EXAMES LABORATORIAIS.....	39
3.4.1 Sorodiagnóstico.....	39
3.4.1.1 Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT).....	40
3.4.1.2 Prova de soroglutinação lenta em tubos e teste do 2-mercaptoetanol (SAL e 2-ME).....	39
3.4.1.3 Prova da fixação do complemento (FC).....	40
3.4.1.4 Teste de polarização fluorescente (PF).....	41
3.4.2 Cultivo microbiológico.....	42
3.4.2.1 Cultivo microbiológico de amostras de urina.....	43
3.4.2.2 Cultivo microbiológico de amostras de <i>swab</i> vaginal.....	43
3.4.2.3 Identificação bacteriana.....	43
3.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	43
3.4.3.1 Extração de ácidos nucleicos de amostras clínicas e de colônias bacterianas.....	44
3.4.3.2 Extração de ácidos nucleicos oriundas de colônias puras.....	44
3.4.3.3 Extração de ácidos nucleicos de amostras de urina.....	45
3.4.3.4 Extração de ácidos nucleicos de amostras de <i>swab</i> vaginal.....	45
3.4.3.5 Reação de amplificação de ácidos nucleicos.....	46
3.4.3.6 Oligonucleotídios iniciadores (<i>primers</i>) empregados.....	46
3.4.3.7 Condições de amplificação de ácidos nucleicos.....	47
3.4.3.8 Análise do produto amplificado.....	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4 RESULTADOS	49
4.1 SOROLOGIA.....	49
4.2 CULTIVO MICROBIOLÓGICO.....	60

4.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	61
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma antropozoonose infecto-contagiosa sistêmica, de evolução crônica, causada por bactérias intracelulares facultativas pertencentes ao gênero *Brucella*. A infecção acomete preferencialmente os sistemas mononuclear fagocitário, reprodutivo e osteoarticular dos animais domésticos, silvestres e do homem (CORBEL; BRINLEY; MORGAN, 1984).

O Gênero *Brucella* é constituído por bactérias em forma de coco-bacilos pequenos, pleomórficos, Gram negativos, não flagelados e não formadores de esporos. As brucelas podem ser divididas em dois grupos antigenicamente distintos, de acordo com a presença ou ausência do antígeno O de superfície: as lisas ou clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. neotomae*) e as rugosas (*B. canis* e *B. ovis*) (CORBEL; BRINLEY; MORGAN, 1984).

São reconhecidas seis espécies clássicas de *Brucella*, cada uma delas acometendo um hospedeiro preferencial. A *Brucella melitensis* é responsável pela brucelose ovina e caprina e por infecções severas em humanos; a *B. abortus* é o principal agente etiológico da brucelose bovina e bubalina; a *B. suis*, acomete principalmente os suínos; a *B. ovis* e a *B. canis* são responsáveis, respectivamente, pela epididimite em ovinos e pela brucelose canina, enquanto a *B. neotomae* foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida*. Algumas espécies, como *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* são ainda subdivididas em diversos biótipos (CORBEL; BRINLEY; MORGAN, 1984). Além das seis espécies clássicas, novas espécies de *Brucella* foram descritas recentemente: *Brucella ceti* e *B. pinnipedialis* foram isoladas de mamíferos marinhos da ordem dos cetáceos e pinípedes, respectivamente, em diversas localidades (FOSTER et al., 2002); *Brucella microti*, isolada do roedor *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008) e de raposas da espécie *Vulpes vulpes* (SCHOLZ et al., 2009); e ainda a *B. inopinata*, isolada de humanos, cujo reservatório animal ainda não foi identificado (SCHOLZ et al., 2010).

Recentemente, foi relatado o isolamento de estirpes de *Brucella* de anfíbios da espécie *Pyxicephalus edulis* oriundos da Tanzânia (EISENBERG et al., 2012), de primatas não-humanos natimortos (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2009) e de três espécies de roedores na Austrália (TILLER et al., 2010). Estas estirpes apresentaram características genotípicas e

fenotípicas distintas das espécies de *Brucella* até então reconhecidas, indicando tratar-se, possivelmente, de novas espécies dentro do gênero.

A brucelose apresenta ampla distribuição mundial (FAO, 2010) e constitui uma importante zoonose, acarretando problemas do ponto de vista de Saúde Pública. No Brasil, já foram isoladas as seguintes espécies e biovars de *Brucella*: *B. abortus* biovars 1, 2 e 3; *B. suis* biovar 1; *B. ovis* e *B. canis* (POESTER et al., 2002).

A principal espécie de *Brucella* responsável pela grande maioria das infecções em bovinos e bubalinos é a *B. abortus*, especialmente o biovar 1. Porém, estes animais também são suscetíveis à infecção por *B. melitensis* e *B. suis* (LAGE et al., 2006).

1.1 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E IMPORTÂNCIA DA BRUCELOSE EM BOVINOS E BUBALINOS

O último inquérito epidemiológico realizado em 15 estados brasileiros, com o objetivo de verificar a situação epidemiológica da brucelose nos bovinos e bubalinos determinou uma prevalência de focos de brucelose variando de 0,02% a 41,19% (AZEVEDO et al., 2009; CHATE et al., 2009; DIAS et al., 2009a,b; GONÇALVES et al., 2009a,b; KLEIN-KUNNEWIEK et al., 2009; MARVULO et al., 2009; NEGREIROS et al., 2009; OGATA et al., 2009; ROCHA et al., 2009; SILVA et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009; VILLAR et al., 2009; ALVES et al., 2009). O inquérito não fez distinção entre as espécies bovinas e bubalinas.

O primeiro relato de isolamento de *Brucella* em leite de búfalas foi realizado em 1948 no município de Cairo (GENTILE, 1957). No Brasil, a brucelose em búfalos foi relatada pela primeira vez por Santa Rosa et al. (1969), que reportaram 27 de 66 (40,9%) búfalos retores ao teste soroaglutinação rápida em placa. Já o primeiro isolamento de *Brucella* em bubalino no Brasil foi feito por Ogassawara et al. (1969) do conteúdo de um higroma articular. Desde então, a brucelose bubalina vem sendo escassamente evidenciada por meios de levantamentos sorológicos e/ou bacteriológicos em algumas localidades brasileiras, com frequência de ocorrência variável entre 1,26% e 11%, de acordo com a região, a população examinada e os testes laboratoriais empregados no diagnóstico (SANTA ROSA et al., 1969; MATHIAS et al., 1998; FUJII et al., 2001; MOTTA et al., 2002).

A brucelose é uma enfermidade presente na lista da OIE, sendo considerada uma doença com importância socioeconômica e/ou para saúde pública e consequências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos, sendo motivo de restrições comerciais no mercado internacional (OIE, 2012).

Nos bovinos, os prejuízos econômicos causados pela brucelose são bem caracterizados e são decorrentes da ocorrência de abortamentos, baixos índices reprodutivos, morte de bezerros, redução da produção de carne e leite, aumento da taxa de reposição de animais, interrupção de linhagens genéticas e redução do valor comercial de produtos provenientes de rebanhos de áreas acometidas (FAO, 2006).

Há estimativas indicando que a brucelose bovina é responsável pela diminuição da produção de carne entre 10 e 15%, queda de 10 a 25% na produção de leite, redução de 15% na produção de bezerros, aumento na taxa de reposição dos animais em cerca de 30% e dilatação do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

Na bubalinocultura, é provável que os prejuízos causados pela brucelose sejam semelhantes. De acordo com Marques e Cardoso (1997), a brucelose foi considerada a principal causa de abortamentos em rebanhos bubalinos no Brasil. Das et al (1990) relataram a ocorrência de abortamento entre três meses e meio e quatro meses e meio de gestação em 50% das búfalas estudadas.

1.2 BRUCELOSE COMO ZOONOSE

Além das perdas econômicas, a infecção também é importante do ponto de vista de saúde pública, em função do seu caráter zoonótico. A brucelose humana apresenta caráter ocupacional e acomete principalmente profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição, como veterinários, tratadores, magarefes, laboratoristas. A infecção humana também pode ser decorrente da ingestão de leite *in natura* e de produtos lácteos fabricados com leite contaminado e não pasteurizado. A brucelose humana tem distribuição mundial, ocorrendo com maior frequência em países em desenvolvimento (USDA, 2006).

Os sinais clínicos mais comuns no homem são aqueles observados nos quadros de infecção aguda generalizada, como: febre contínua e intermitente, respiração acelerada, calafrios,

sudorese noturna profusa de odor característico, fadiga, insônia, cefaléia, artralgia, entre outros (ACHA; SZYFRES, 2001). O curso da doença tende à cronicidade, as recidivas de intensidade variada são frequentes e na maioria dos casos a recuperação ocorre em um a dois anos, com ou sem tratamento (PAULIN, 2006b).

A espécie de *Brucella* mais patogênica para humanos é a *B. melitensis*, seguida pela *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. Além dessas, a *B. pinnipedialis* e a *B. ceti* também foram relacionadas a infecções humanas.

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA

Considera-se que os mecanismos de transmissão da brucelose bubalina são semelhantes aos observados na brucelose bovina. A principal fonte de infecção é a fêmea gestante, que elimina grandes quantidades de bactérias nos fetos abortados, membranas fetais e secreções uterinas por ocasião do abortamento ou parto e também durante o período puerperal (SAMARTINO; ENRIGHT, 1993) contaminando pastagens, alimentos e fontes de água. A transmissão pode ocorrer pela pele e mucosa conjuntiva, mas acontece principalmente pela mucosa oronasal, pela ingestão de água e alimentos contaminados com o agente etiológico ou ainda pelo hábito de lambar ou cheirar as crias recém-nascidas (PAYNE, 1959; CRAWFORD et al., 1990; KO; SPLITTER, 2003). As brucelas são capazes de sobreviver durante períodos prolongados no solo, fezes, dejetos e água, em condições ambientais favoráveis, aumentando as chances de exposição dos animais ao agente infeccioso e o risco de transmissão. A transmissão aos bezerros pode ocorrer pela ingestão de leite contaminado, já que fêmeas infectadas podem eliminar brucelas por esta via ou ainda verticalmente pela via transplacentária (WILESMITH, 1978; NICOLETTI, 1980; RAY et al., 1988).

A eliminação de *Brucella* pelo sêmen de touros infectados ocorre em maior quantidade durante a fase aguda da infecção, tornando-se depois intermitente (LAMBERT et al., 1963). A transmissão da infecção pela via genital, em condições naturais, não constitui uma via importante de transmissão, contudo pode ter relevância na inseminação artificial, quando o

sêmen é introduzido diretamente no útero, e não na vagina, como ocorre na monta natural (RANKIN, 1965; MCCAUGHEY; HANNA, 1973).

A eliminação de brucelas pela via vaginal ocorre preferencialmente durante 15 dias após o abortamento ou parto nas vacas infectadas. Em outros períodos do ciclo reprodutivo, a eliminação pode ocorrer de forma intermitente e em quantidades reduzidas, durante vários anos (NICOLETTI, 1980; STRINGFELLOW et al., 1983; CRAWFORD et al., 1990).

Animais nascidos de vacas infectadas podem infectar-se no útero ou logo após o parto. Estes animais podem desencadear a condição de “portador latente”, que é um fenômeno relatado numa frequência entre 1 e 9% das novilhas nascidas de fêmeas infectadas (BISHOP et al., 1994). Essas novilhas apresentam-se sorologicamente negativas ou com títulos instáveis e soroconvertem na metade da primeira prenhez. Nesse caso a vacinação é ineficaz (BISHOP et al., 1994). Animais infectados não identificados, além de servirem como fonte de infecção para o restante do rebanho, podem eliminar a bactéria pelo leite.

Quando a brucela é introduzida em uma população suscetível, o principal sinal clínico observado é o abortamento, que pode ocorrer em grande porcentagem das fêmeas em gestação (ACHA; SZYFRES, 2001). Na prenhez subsequente, há reinvasão do útero, porém a proporção de abortamentos cai cerca de 20 a 25%. Já na terceira gestação, o abortamento raramente ocorre. Passada essa fase aguda de infecção no rebanho, sobrevém à crônica, quando apenas os animais suscetíveis introduzidos na população ou novilhas de primeira cria abortam (BISHOP et al., 1994; ACHA; SZYFRES, 2001).

Fosgate et al. (2002) sugerem haver características epidemiológicas diferentes entre bovinos e bubalinos, ratificando a necessidade de mais estudos neste tema, já que a maioria dos estudos referentes à brucelose animal aborda a brucelose bovina. Algumas características referentes ao comportamento desta espécie animal podem ser responsáveis por diferenças na epidemiologia da infecção. Como exemplo, podemos citar o fato destes animais apresentarem o hábito de banhar-se e de pastorear em aguadas e açudes, tornando-os mais expostos a determinados microrganismos, dentre os quais podemos destacar a *Brucella* (WRAY, 1975; MARQUES; CARDOSO, 1997). Além disto, esses animais são quase que exclusivamente criados de forma extensiva, proporcionando acesso a diversos ambientes, podendo aumentar assim as chances de exposição ao agente.

1.4 VACINAÇÃO CONTRA BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu em 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) com o objetivo de diminuir a incidência e prevalência da brucelose e tuberculose bovina e bubalina, promovendo assim a competitividade da pecuária nacional e reduzindo o impacto destas zoonoses na saúde humana e animal. O programa não faz distinção entre as espécies bovinas e bubalinas (LAGE et al., 2006).

As principais estratégias do programa são a vacinação obrigatória contra a brucelose bovina e bubalina em todo território nacional, utilizando-se a vacina B19, a realização de testes laboratoriais para movimentar animais de reprodução e a certificação facultativa de propriedades como livres ou monitoradas para brucelose (LAGE et al., 2006).

A vacinação das bezerras com a vacina B19 constitui uma ferramenta fundamental no programa brasileiro de controle da brucelose. Com a obtenção de coberturas vacinais superiores a 80% ao longo dos anos é possível reduzir a prevalência da infecção a níveis que permitam o incremento das ações de erradicação, baseada na busca ativa de focos e no sacrifício dos animais reatores (ACHA; SZYFRES, 2001).

Godfroid et al. (2011) descreveram que a vacina ideal deveria apresentar: (1) imunidade consistente e de longa duração; (2) proteção cruzada contra outras espécies de *Brucella*; (3) inocuidade, independente do estado fisiológico do animal; (4) eficiência em dose única; (5) ausência de interferência nos testes sorológicos usados no diagnóstico da infecção; (6) ausência de virulência para humanos; (7) ausência de eliminação no ambiente; (8) estabilidade; (9) baixo custo. Ainda que a vacina B19 não preencha todos estes requisitos, ainda é considerada uma das mais eficientes vacinas desenvolvidas para brucelose bovina.

A B19 tem sido a vacina mais utilizada no mundo, sendo empregada no controle da brucelose em vários países que conseguiram reduzir a prevalência ou mesmo erradicar a infecção (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). A vacina B19 é uma vacina viva atenuada, de baixo custo e capaz de induzir à imunidade duradoura. Bovinos vacinados apresentam imunidade até aproximadamente nove anos de idade. Entretanto, a produção e a persistência dos títulos vacinais dependem da idade dos animais à vacinação (SELEEM et al., 2010).

A vacinação compulsória com a cepa B19 viva, na dose de 60-120 X 10⁹ UFC/dose pela via subcutânea, das bezerras entre três e oito meses de idade é preconizada pelo programa brasileiro.

A estirpe 19 de *Brucella abortus* (B19) é uma estirpe espontaneamente atenuada, descoberta pelo Dr. John Buck em 1923 (NICOLETTI, 1990), que vem sendo utilizada desde 1930 como uma eficiente ferramenta na prevenção da brucelose em bovinos e bubalinos (CRASTA et al., 2008). Sperry & Robertson (1975B) demonstraram que a cepa 19 de *Brucella abortus* não possui a enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase, fundamental na rota catabólica do eritritol. A ausência dessa enzima promove, além do acúmulo do composto intermediário tóxico D-eritrose-1-fosfato, a depleção dos níveis de ATP. Essa sequência de eventos leva à inibição do crescimento bacteriano (SANGARI et al., 2000). A ausência da produção da enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase na estirpe B19 é consequência de uma deleção do tamanho de 702 pares de bases no gene *ery* (SANGARI et al., 1994).

Desta forma, a cepa vacinal B19 difere de cepas virulentas de *B. abortus* por sua sensibilidade ao eritritol (JONES et al., 1965). Entretanto, cepas mutantes de B19, tolerantes ao eritritol, podem crescer a partir de culturas de B19 sensíveis a este composto, em taxas variáveis (SANGARI et al., 1996).

Desta forma, a estirpe B19 é atenuada quando aplicada em bezerras nesta faixa etária, mas pode causar infecção quando aplicada em machos ou em fêmeas com idade superior a 8 meses (DANKS, 1943; KING; FRANK, 1961; LAMBERT et al., 1964). A estirpe B19 também é virulenta para o homem e outras espécies animais, sendo que infecções humanas decorrentes de acidentes vacinais já foram relatadas (WALLACH et al., 2008). Os benefícios de proteção proporcionados pela vacina B19 tem sido demonstrado por ensaios experimentais onde estima-se que 65-75% de todos os animais vacinados foram completamente protegido durante toda a vida produtiva (MANTHEI, 1968). Em bovinos vacinados, a estirpe B19 multiplica-se apenas por um curto período após a vacinação ocorrendo então clearance da estirpe vacinal, de maneira que a mesma raramente persiste por períodos prolongados no organismo animal, como demonstrado em estudos bacteriológicos (MINGLE et al., 1941). Há alguns relatos na literatura científica de persistência da estirpe B19 no úbere e em articulações, em uma pequena porcentagem dos animais vacinados (BRACEWELL; CORBEL, 1980; WYN-JONES et al., 1980; NICOLETTI, 1981).

Estudos recentes realizados em bovinos, porém mostraram a excreção da estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias e em várias fases do ciclo reprodutivo, vacinadas contra brucelose na idade recomendada pelo PNCEBT. Neste estudo, a detecção da estirpe vacinal em amostras de leite e urina foi realizada pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) e houve a detecção de DNA da estirpe B19 de *B. abortus* desde o estro até 30 dias pós-parto (PACHECO, 2007).

Além disso, a B19 é estirpe lisa de *Brucella*, de maneira que os animais vacinados desenvolvem anticorpos que não podem ser diferenciados dos anticorpos produzidos numa infecção natural por *B. abortus*, pelos testes sorológicos rotineiramente empregados no diagnóstico da infecção. A magnitude e duração destes anticorpos vacinais dependem de vários fatores, como idade dos animais na vacinação, dosagem e via de administração (NICOLETTI et al., 1990). Nas bezerras vacinadas entre três e oito meses de idade, ocorre primeiramente a formação de anticorpos da classe IgM, seguida por anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2. Vários estudos realizados em bovinos indicam que após os 24 meses de idade, os títulos de anticorpos vacinais já atingiram valores que não são detectáveis pelos testes sorológicos rotineiros, de maneira que esta é a idade preconizada pelo MAPA para a realização dos exames sorológicos em animais que foram vacinados (KING; FRANK, 1961; AGUIRRE et al., 2002; LAGE et al., 2006).

1.5 DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM BOVINOS E BUBALINOS

O diagnóstico laboratorial da brucelose pode ser baseado na utilização de métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos, utilizando testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos anti-*Brucella* spp., são imprescindíveis ao diagnóstico laboratorial da brucelose em bovídeos, por apresentarem baixo custo, praticidade e rapidez na detecção de animais reatores. São, portanto utilizados no diagnóstico populacional da infecção, permitindo o monitoramento de propriedades e regiões e a vigilância de regiões onde a doença foi erradicada (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; GALL; NIELSEN, 2004). No caso da brucelose bubalina, foram definidos como testes laboratoriais oficiais os mesmos preconizados pelo MAPA para o diagnóstico da brucelose bovina. O teste do anel em leite (TAL) e o teste de

soroaglutinação com o antígeno acidificado tamponado (AAT) são empregados como métodos de triagem diagnóstica e o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) e de fixação de complemento (FC) são utilizados como provas confirmatórias (LAGE et al., 2006).

Novos testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico da brucelose em bovinos e bubalinos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico da infecção, como o teste do ELISA indireto (I-ELISA) (NIELSEN et al., 1994), o teste de ELISA competitivo (C-ELISA) (SAMARTINO et al., 1999) e o teste de Polarização de Fluorescência (PF) (NIELSEN et al., 1998). Estas provas laboratoriais apresentaram valores de sensibilidade e especificidade superiores aos obtidos com as provas sorológicas do AAT, 2-ME e FC (NIELSEN, 2002).

Um diagnóstico positivo para brucelose significa a remoção do animal da população, desta maneira as características de sensibilidade e especificidade dos testes são muito importantes, pois resultados falso-positivos significam sacrificar animais sadios, e resultados falso-negativos significam deixar fontes de infecção em contato com animais sadios (PAULIN, 2006).

O diagnóstico laboratorial direto da brucelose bubalina, assim como nos bovinos, pode ser realizado em materiais clínicos dos animais suspeitos de infecção, através de métodos bacteriológicos, imuno-histoquímica e métodos de detecção de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR). O diagnóstico direto da brucelose em bovinos e búfalos pode ser realizado em produtos de abortamento (feto, placenta e secreções vaginais), órgãos como baço, fígado, linfonodos, glândula mamária, órgãos reprodutivos, sêmen, urina e leite (LAGE et al., 2006).

Os métodos diretos não são utilizados como métodos rotineiros de diagnóstico, com o objetivo de individualizar fontes de infecção, mas são importantes na confirmação bacteriológica de focos da doença e na caracterização das estirpes de *Brucella* circulantes (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

1.5.1 Teste do antígeno acidificado tamponado (AAT)

O teste do AAT é um teste qualitativo utilizado para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina. É um teste rápido, barato, de fácil execução e possui alta sensibilidade diagnóstica (KRUZE, 1975). É referido pela OIE (2009) como um adequado teste de triagem, eficiente para garantir a ausência da infecção em rebanhos livres da doença. Wright e Nielsen (1990) observaram que a acidificação do antígeno, do pH 7.0 para o pH 3.65 ± 0.05 , aumentava o poder de aglutinação das IgG1 bovinas e reduzia a atividade das IgM. Essa alteração no pH aprimorou a especificidade da prova (LEVIEUX, 1974)

Contudo, resultados falsos positivos podem ser observados em decorrência de anticorpos vacinais ou reações cruzadas com microrganismos que compartilham antígenos com o gênero *Brucella*, em especial a espécie *Yersinia enterocolitica* (MUNOZ et al., 2005). Desta forma, resultados positivos devem ser confirmados utilizando-se testes de maior especificidade.

1.5.2 Prova do 2-mercaptoetanol (2ME)

A prova de 2ME é uma prova semiquantitativa utilizada como teste confirmatório da brucelose nos bovinos e bubalinos. Os soros a serem testados são previamente tratados com o composto químico 2-mercaptoetanol (ME), com a finalidade de romper as pontes dissulfídicas das moléculas de IgM, desnaturando-as em cinco monômeros não aglutinantes (ROSSI; CANTINI, 1969; STEMSHORN et al., 1985; TIMONEY et al., 1988). Desta forma, o teste detecta apenas anticorpos da classe IgG nos soros. O 2-mercaptoetanol também tem a função de reduzir o pH da reação, aumentando assim a reatividade da IgG1 frente ao antígeno (NIELSEN; DUNCAN, 1990).

O teste deve ser realizado em paralelo com o teste de soroaglutinação lenta em tubos, no qual os soros testados não são tratados com a solução de 2-ME. A interpretação dos resultados é realizada pela diferença entre os títulos de anticorpos presentes dos soros sem tratamento (prova lenta) frente aos soros tratados com 2-ME (LAGE et al., 2006). Os soros com predomínio de IgM podem apresentar resultado positivo no teste de SAL mas negativo no teste de 2ME, o que pode ser consequência de reações inespecíficas ou da presença de anticorpos vacinais residuais (LAGE et al., 2006).

1.5.3 Teste da fixação do complemento (FC)

O teste de FC é considerado um teste confirmatório, sendo recomendado pelo Código Zoosanitário Internacional, para o comércio e transporte internacional de animais (OIE, 2009). Trata-se de uma técnica de execução complexa

A técnica possui algumas variações, sendo que a execução a quente, na qual a mistura antígeno de Brucella, soro dos animais a serem testados e soro de cobaios (sistema complemento) são incubados a 37 °C durante 30 minutos, apresenta menor atividade anticomplementar. Em contrapartida, essa variação apresenta maior frequência e intensidade de efeito prozona, exigindo, portanto, a diluição seriada das amostras (PLACKETT; ALTON, 1975; QUATREFAGES; PIERRE, 1975; PAULIN, 2003; OIE, 2009).

Nos ruminantes, anticorpos da classe IgG1 e IgM são capazes de realizar a fixação do complemento. Contudo, a capacidade de fixação de complemento pelas moléculas de IgM fica comprometida pelo calor usado no processo de inativação do soro, elevando assim a especificidade do teste. Os soros a serem testados devem ser inativados a 58°C previamente à realização do teste, com o objetivo de se reduzir a atividade anticomplementar (ALTON et al., 1988).

O teste apresenta elevada sensibilidade diagnóstica, sendo capaz de detectar anticorpos da classe IgG1 a partir dos 14 dias pós infecção (KRUZE, 1975). A especificidade do teste também é elevada. O TFC é menos sensível à detecção de anticorpos produzidos em resposta à cepa B19 de *B. abortus*, apresentando maior especificidade no diagnóstico de animais que foram vacinados (ALTON et al., 1976).

1.5.4 Teste da polarização fluorescente (PF)

O TPF é um teste simples e de fácil execução para mensurar a interação antígeno/anticorpo. A plataforma desenvolvida para a realização do teste permite que o mesmo possa ser realizado tanto em instalações laboratoriais, quanto no campo (OIE, 2009). O teste requer volumes menores de soro do que os testes convencionais, não sofre interferência da

hemólise (SAMARTINO et al., 1999b; NIELSEN et al., 2005) e, embora não exista uma explicação razoável, é capaz de distinguir animais vacinados de não vacinados (SAMARTINO et al., 1998).

O teste é baseado na propriedade de rotação aleatória das moléculas em solução. A taxa de rotação das moléculas em solução pode ser influenciada pelo tamanho molecular das mesmas, por sua estrutura terciária, e por fatores como viscosidade e temperatura da solução. O tamanho da molécula é o principal fator que influencia a taxa de rotação, sendo inversamente relacionadas, ou seja, quanto menor o tamanho da molécula maior a taxa de rotação (OIE, 2009). Se uma molécula for conjugada a um fluorocromo, a rotação da mesma pode ser determinada medindo-se a intensidade de luz polarizada, de forma que uma molécula de menor tamanho, que apresenta maior taxa de rotação, irá despolarizar a luz plana polarizada mais rapidamente. Assim, pequenos antígenos, menores do que 50 kDa conjugados com fluorocromo, irão apresentar menor taxa de rotação quando combinados com anticorpos, e, portanto irão despolarizar a luz em menor taxa. As leituras são feitas em unidades de milipolarização (mP).

O TPF utilizado para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina utiliza como antígeno um fragmento de baixo peso molecular (22 kD) da cadeia O do LPS de membrana da *B. abortus* cepa 1119-3, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína. Esta redução na taxa de rotação pode ser mensurada pelo analisador de polarização fluorescente (OIE, 2009). O ensaio é realizado por diluição do soro, sangue, leite ou num tampão adequado, obtendo-se uma leitura de linha de base para a amostra, adicionando a OPS-FITC e permitindo um período de dois minutos ou menos de incubação apropriado. A leitura final é obtido, a partir do qual a actividade de fundo é subtraído.)

O ensaio foi padronizado e validado para bovinos, bubalinos, suínos, caprinos, ovinos, bisões e cervídeos infectados por espécies lisas de *Brucella*. Para bovinos, a OIE (2009) estabelece um ponto de corte entre 90 e 100 mP, mas recomenda que o teste seja validado e o ponto de corte estabelecido para cada localidade.

Foi realizada, no Brasil, uma validação interlaboratorial do TPF utilizando soros bovinos (MATHIAS et al., 2010). O ponto de corte de 93,6 mP otimizou tanto o valor de sensibilidade, quanto o de especificidade (97,3 e 98,3%, respectivamente) da prova. O valor encontrado foi próximo aos de Nielsen et al. (1998), Dajer et al. (1999) e Samartino et al. (1999), que foram respectivamente 90, 87 e 89,9 mP. Paulin et al. (2012) demonstrou que o TPF mostrou-se

adequado também ao diagnóstico sorológico da brucelose nos bubalinos utilizando o mesmo ponto de corte estabelecido para a espécie bovina. Montagnaro et al. (2008), utilizou o ponto de corte de 117 mP e encontrou valores de sensibilidade e especificidade relativas ao TFC de 92,6 e 91,2 %, respectivamente, ao avaliar soros bubalinos na Itália. Samartino et al. (1999), utilizando o ponto de corte de 117 mP, encontrou valores de especificidade para bezerras bovinas vacinadas com a vacina B19 de 64,9%, 92,1%, 98,6% e 97,1%, respectivamente aos, 26, 89, 242 e 272 dias pós-vacinação.

1.5.5 Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico pode apresentar baixos valores de sensibilidade, dependendo do material biológico utilizado para o diagnóstico, a fase da infecção, a carga microbiana e o nível de contaminação secundária do material (GALLIEN et al., 1998), de forma que resultados negativos não necessariamente indicam ausência de infecção. Além disso, o cultivo bacteriológico de *Brucella* é laborioso, demanda tempo, tem custo elevado e pode representar elevado risco de infecção para os laboratoristas (CORTEZ et al., 2001).

No caso das fêmeas infectadas, os materiais indicados para a realização do cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella* são as secreções vaginais, envoltórios e tecidos fetais, especialmente no período pós-abortamento, quando a quantidade bacteriana eliminada é elevada. Uma alta porcentagem das vacas infectadas podem eliminar brucelas pelo trato genital na ocasião do parto. Estima-se que 85% dos animais recentemente infectados e 15% dos com infecção crônica eliminam a bactéria, desde alguns dias antes do parto e até trinta dias depois. O leite também pode ser utilizado para o cultivo microbiológico, porém, a eliminação da *Brucella* por este material pode ser intermitente, de forma que a sensibilidade do cultivo pode ser variável (ACHA; SZYFRES, 2001).

Em fêmeas da espécie canina, a eliminação de *Brucella* pela via urinária em quantidades elevadas ocorre, geralmente, durante a fase de bacteremia, quando o agente também pode ser isolado em amostras de sangue (SERIKAWA; MURAGUCHI, 1979). Em fêmeas bovinas vacinadas com a estirpe B19 de *Brucella abortus*, Pacheco (2007) observou a eliminação intermitente da estirpe pela urina.

1.5.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) vem sendo empregada como instrumento para o aprimoramento do diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e no homem, por apresentar-se mais sensível que os métodos bacteriológicos. Considerando sua rapidez de execução em relação ao cultivo bacteriológico, a PCR tem sido uma alternativa promissora ao diagnóstico direto de organismos de crescimento lento ou fastidioso (BRICKER, 2002; DAHOUK et al., 2003). A PCR também pode ser usada para a detecção de organismos patogênicos em alimentos (GALLIEN et al., 1998) e em amostras clínicas contaminadas. Outra vantagem da técnica é a capacidade de detectar pequenas quantidades do DNA de microrganismos, independentemente de sua viabilidade (ERLICH et al., 1991).

A PCR foi empregada com sucesso para a detecção de *Brucella* em vários tipos de amostras biológicas provenientes de diversas espécies hospedeiras, como sangue (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995, MATAR; KHNEISSER; ABDELNOOR, 1996; QUEIPO-ORTUNO et al., 1997; MORATA; QUEIPO-ORTUÑO; COLMENERO, 1998; MORATA et al., 1999; NAVARRO; CASAL; SOLERA, 2004; NAVARRO et al., 1999, 2002;2000; GUARINO et al., 2000; ZERVA et al., 2001AL-NAKKAS et al., 2002; NIMRI, 2003; VIEIRA, 2004; AL-NAKKAS; MUSTAFA; WRIGHT, 2005; ELFAKI et al., 2005a), soro (ZERVA et al., 2001; ELFAKI et al., 2005b), leite (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995, 2000; ROMERO et al., 1995; RIJPENS et al., 1996; ROMERO; LOPEZ-GONI, 1999; SREEVATSAN et al., 2000; TANTILLO et al., 2001;HAMDY; AMIN, 2002), sêmen (AMIN; HAMDY; IBRAHIM, 2001; MANTEROLA et al., 2003; KEID et al., 2007c), swab vaginal (KEID et al., 2007b), queijo (SERPE et al., 1999; TANTILLO et al., 2001; TANTILLO; DI PINTO; BUONAVOGLIA, 2003; MIYASHIRO, 2004), órgãos (FEKETE; BANTLE; HALLING, 1992; GALLIEN et al., 1998; ÇETINKAYA et al., 1999; CORTEZ et al., 2001; MORATA et al., 2001; COLMENERO et al., 2002; RICHTZENHAIN et al., 2002; LEYLA; KADRI; UMRAN, 2003;) e ainda urina, fluido sinovial, fluido cerebrospinal e material purulento (MORATA et al., 2001; COLMENERO et al., 2002; SALGADO, 2006).

Oligonucleotídeos iniciadores direcionados a diversas sequências alvo foram descritos na literatura, em ensaios específicos para detecção do gênero, de espécies e estirpes vacinais de *Brucella*, apresentando valores de sensibilidade e especificidade variáveis (MATAR et al., 1996; QUEIPO-ORTUNO et al., 1997; GALLIEN et al., 1998; MORATA et al., 1998; MORATA et

al., 1999, 2001; NAVARRO et al., 1999, 2002; CORTEZ et al., 2001; KEID, 2001; TANTILLO et al., 2001; ZERVA et al., 2001; COLMENERO et al., 2002; RICHTZENHAIN et al., 2002; ELFAKI et al., 2005a,b; KEID et al., 2007a).

Existem poucos estudos relatando a eficácia da vacinação com a B19 em bubalinos, bem como o perfil sorológico e microbiológico de fêmeas vacinadas. Caporale et al. (2010) demonstraram que animais vacinados com a vacina B19 foram resistentes à infecção experimental pela estirpe 544 de *B. abortus*, realizada 33 dias após a vacinação. Jamal et al. (2003) demonstraram que o decréscimo nos títulos de anticorpos vacinais, detectados pelos testes de SAT e 2-ME, pode ser observado 91 dias após a vacinação, em bezerras bubalinas vacinadas entre 8 e 10,5 meses de idade. Nardi Júnior et al. (2012) avaliaram o perfil sorológico de 21 bezerras da espécie bubalina, com idade entre 3 e 8 meses, vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* utilizando os testes AAT, 2ME e TFC. Aos 15 dias pós-vacinação, 95% dos animais apresentaram resultados positivos em todos os testes e aos 270, 300 e 360 dias pós-vacinação, nenhum animal apresentou reações nos testes TFC, AAT e 2ME, respectivamente.

2 OBJETIVOS

Em virtude do escasso conhecimento em relação ao comportamento da estirpe B19 de *B. abortus* quando este agente é empregado como imunógeno para espécies bubalinas e também da acurácia das provas sorodiagnósticas em identificar respostas de anticorpos a esta estirpe de *Brucella*, é apresentada a presente investigação cujos objetivos são:

estudar a cinética de eliminação da vacina viva B19 por bezerras bubalinas vacinadas entre os 3 e 8 meses de idade, utilizando como marcador de eliminação os resultados de cultivo microbiológico e a PCR.

Avaliar a especificidade das provas diagnósticas AAT, 2ME, FC e PF para a detecção de resposta sorológica de fêmeas bubalinas estimuladas por vacina viva com a estirpe atenuada de *B. abortus* B19.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS

Foram duas propriedades de criação de bubalinos de produção de leiteira localizadas no Estado de São Paulo: a propriedade A localizada no município de Sarapuí, SP e a propriedade B localizada no município de Pirassununga, SP.

Propriedade A era constituída por um rebanho de 232 animais, sendo 77 vacas em lactação, 23 vacas secas, 49 novilhas, 42 bezerras, 3 tourinhos, 11 garrotes e 27 bezerros. No período das águas, todos os animais eram mantidos em sistema de pastejo rotacionado e, no período da seca, as vacas em lactação receberam suplementação à base de silagem de gramíneas, cana e uréia.

Na propriedade B o rebanho era composto por 70 animais, sendo 23 vacas em lactação, 12 novilhas, 11 bezerras, 14 garrotes, 9 bezerros e 1 touro . Os animais eram mantidos exclusivamente em sistema de pastagem, sem suplementação no período de seca.

Ambas as propriedades possuíam um rígido sistema de identificação individual dos animais e realizavam a vacinação contra brucelose conforme preconizado pela legislação brasileira.

Antes do início do experimento e após uma avaliação sorológica do rebanho, ambas as propriedades foram consideradas não infectadas por *Brucella abortus*.

Um total de 44 bezerras bubalinas, com idade entre 3 e 8 meses foram utilizadas no projeto, sendo 33, da raça Murrah provenientes da propriedade A e 11 da raça Mediterrâneo procedentes da propriedade B.

Os animais foram classificados em seis diferentes faixas etárias, conforme a idade que apresentavam no início do experimento (dia 0). O número de animais de cada propriedade, pertencente a cada uma das faixas etária pode ser visualizado na tabela 1.

Tabela 1 - classificação das bezerras bubalinas conforme a faixa etária - São Paulo - 2013

Faixa etária	Idade dos animais (dias)	Idade dos animais (meses)	Número de animais da propriedade A	Número de animais da propriedade B	Total
A	90 a 119	3,0 a 3,9	1	0	1
B	120 a 149	4,0 a 4,9	3	1	4
C	150 a 179	5,0 a 5,9	10	1	11
D	180 a 209	6,0 a 6,9	8	1	9
E	210 a 239	7,0 a 7,9	5	6	11
F	240 a 269	8,0 a 8,9	6	2	8
Total			33	11	44

3.2 VACINAÇÃO

Os 44 animais foram vacinados, pela via subcutânea, com a dose estabelecida pelo PNCEBT do MAPA, ou seja, 2 mL da vacina viva atenuada preparada com a estirpe B19 de *Brucella abortus*, contendo de 60 a 120 bilhões de UFC (BRASIL, 2004). O dia em que a vacinação foi realizada correspondeu ao dia 0 (D0) do experimento.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foi realizado o monitoramento periódico, sem intervalo fixo, das 44 bezerras, desde o dia em que a vacinação contra brucelose foi realizada (D0) até que os animais completaram 24 meses de idade (720 dias de idade).

Em cada monitoramento foram realizadas coletas de amostras de sangue, urina e *swab* vaginal de cada bezerra, totalizando 16 coletas de cada animal.

As coletas de amostras biológicas dos animais pertencentes à propriedade A foram realizadas nos seguintes dias pós-vacinação: D0, D7, D14, D21, D28, D59, D91, D126, D151,

D231, D286, D353, D406, D452, D494 e D552. Já as coletas dos animais da propriedade B foram realizadas nos dias D0, D8, D14, D21, D28, D45, D56, D105, D136, D164, D197, D232, D268, D303, D331, D366 pós-vacinação.

3.3.1 Amostras de soro

Considerando os 44 animais amostrados, um total de 672 amostras de sangue foram coletadas ao longo do período de monitoramento, por punção da veia jugular, utilizando-se tubos à vácuo estéreis, sem adição de anticoagulante. As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte ao laboratório. As amostras coletadas foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos, para a obtenção do soro. Duas alíquotas de cada amostra de soro foram acondicionadas em microtubos e conservadas à temperatura de - 20°C.

3.3.2 Amostras de urina

Considerando os 44 animais amostrados, foram coletadas 518 amostras de urina ao longo do período de monitoramento. As coletas foram realizadas por micção espontânea, utilizando-se frascos coletores universais estéreis. As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte ao laboratório, sendo então separadas em duas alíquotas. Uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi utilizada para o isolamento bacteriano, o restante foi acondicionado à temperatura de - 20°C, dentro do próprio frasco coletor, para posteriormente serem testadas pela PCR. Foram obtidos volumes variáveis de amostra e, tendo em vista que nem todos os animais urinavam ao entrarem no tronco de contenção, não foi possível colher urina de todos os animais em todas as datas de coletas.

3.3.3 Amostras de *swab* vaginal

As amostras de *swab* vaginal foram coletadas em duplicata de cada animal, totalizando 1344 amostras, considerando-se as 44 bezerras amostradas durante todo o período de monitoramento.

Um total de 672 amostras de *swab* vaginal foram colhidas utilizando-se *swabs* estéreis acondicionados em frasco contendo meio de transporte de Stuart (STUART, 1959). As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte ao laboratório, sendo então utilizadas para o cultivo microbiológico de *Brucella* spp.

Foram coletadas 672 amostras de *swab* vaginal utilizando-se *swabs* estéreis que, após a coleta, foram armazenados em tubos estéreis secos. As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte ao laboratório, sendo posteriormente armazenadas à temperatura de -20º C até a realização da PCR.

3.4 EXAMES LABORATORIAIS

3.4.1 Sorodiagnóstico

As provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), de soroaglutinação lenta em tubos e soroaglutinação lenta em tubos com 2-mercaptoetanol (SAL e 2-ME) foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) situado no campus de Pirassununga, SP. As provas de fixação do complemento (FC) e polarização fluorescente (PF) foram realizadas no Laboratório de Brucelose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico, situado na cidade de São Paulo, SP.

Todos os soros coletados foram submetidos aos quatro testes sorológicos citados anteriormente.

3.4.1.1 Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT)

A prova de soroaglutinação rápida em placa com o AAT foi realizada conforme protocolo descrito por Lage et al (2006). O antígeno utilizado consiste de uma suspensão celular, inativada pelo calor, da estirpe 1119-3 de *B. abortus*, na concentração de 8,0% e pH 3,65, corada pelo corante Rosa Bengala. O antígeno foi produzido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

3.4.1.2 Prova de soroaglutinação lenta em tubos e teste do 2-mercaptoetanol (SAL e 2-ME)

As provas de SAL e 2-ME foram executadas conforme os protocolos descritos por Lage et al. (2006). Os antígenos utilizados em ambas as provas consiste de uma suspensão celular, na concentração de 4,5% e inativada pelo calor, da amostra 1119-3 de *Brucella abortus*. Os antígenos foram produzidos pelo Instituto Biológico e as provas foram executadas seguindo os protocolos de realização e interpretação descritos por Lage et al. (2006).

3.4.1.3 Prova da fixação do complemento (FC)

A execução da técnica, a titulação da hemolisina, do complemento e do antígeno foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos por Alton et al. (1976). O antígeno empregado foi o mesmo utilizado nas provas de SAL e 2-ME. A suspensão de hemácias de carneiro foi padronizada para a concentração de 3% de células utilizando-se um espectrofotômetro. A hemolisina consistiu em anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro. Foi utilizado soro de cobaio contendo cinco unidades de complemento capazes de hemolisar 50% das hemáceas de carneiro sensibilizadas pela hemolisina (sistema hemolítico).

Foi utilizada a microtécnica à quente com incubação à 37 °C nas duas fases da reação. Todos os soros foram previamente inativados à 58 °C por 30 minutos. As reações foram realizadas em placas de polietileno com 96 poços de fundo “U”. Foram adicionados 25 µL do soro a ser testado (diluição inicial de 1:2 e final de 1:256), 25 µL de antígeno e 25 µL de complemento. Após homogeneização em agitador de microplacas, a reação foi incubada à 37°C por 30 minutos em estufa bacteriológica. Na sequência, foram adicionados 25 µL do sistema hemolítico. As reações foram novamente homogeneizadas e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente, sendo que após os primeiros 15 minutos de estufa, as reações foram novamente agitadas. As placas foram então centrifugadas, sob temperatura de refrigeração, a 1.500 rpm por 10 minutos. Na leitura foi determinado o grau de fixação do complemento observando-se, com base em uma escala de hemólise, a quantidade de hemácias depositadas no fundo do poço e o aspecto do sobrenadante.

O título do soro foi determinado observando-se a maior diluição em que ocorreu a fixação de pelo menos 25% de complemento. Convertendo-se o resultado em unidades internacionais, de acordo com a técnica padronizada pelo Laboratório Central de Veterinária (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1991; OIE, 2009), foram consideradas positivas as amostras com títulos maiores ou iguais a 20 UITFC/mL.

3.4.1.4 Teste de polarização fluorescente (PF)

O antígeno utilizado no teste de PF consistiu do polissacarídeo O (OPS) extraído de células de *B. abortus* e conjugado com isotiocianato de fluoresceína. O teste foi realizado utilizando-se o *Brucella abortus Antibody Test Kit (Diachemix, EUA)*. O kit é composto por um soro controle negativo; um soro controle positivo; um tampão de reação concentrado 25X; e o antígeno conjugado.

O teste foi realizado conforme as indicações do laboratório produtor, conforme descrito abaixo:

- adicionar 990 µL do tampão de reação 1X em tubo de ensaio de borossilicato, com dimensões de 10 mm x 75 mm;
- adicionar 10 µL do soro a ser testado (diluição final de 1:100);

- homogeneizar em vórtex;
- realizar a leitura no equipamento de leitura de polarização fluorescente modelo Sentry 100 (Diachemix Corporation, EUA), para avaliar o estado de polarização do OPS conjugado (branco), obtendo-se um valor expresso em unidades de milipolarização (mP);
- adicionar 10 μ L do antígeno;
- homogeneizar em vórtex;
- incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos;
- realizar a leitura final equipamento modelo Sentry 100 de polarização de fluorescência, para avaliar o estado de polarização do antígeno OPS conjugado com o fluorocromo após a adição do soro, obtendo-se um valor expresso em unidades de milipolarização (mP).

O resultado final para cada amostra, expresso unidades de milipolarização (mP), corresponde ao valor obtido na leitura final subtraído do valor obtido na leitura do branco (leitura inicial).

O ponto de corte utilizado foi o descrito por Mathias et al. (2010) e obtido na validação interlaboratorial realizada no Brasil utilizando soros de bovinos. Amostras com valores iguais ou acima a 93,6 mP foram consideradas positivas.

3.4.2 Cultivo microbiológico

O cultivo microbiológico de *Brucella* spp. a partir de amostras de urina e *swab* vaginal foram realizados no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) situado no campus de Pirassununga, SP. O procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica classe II.

O meio de cultura utilizado foi o ágar triptose (Difco) acrescido de 5% de soro fetal bovino e do suplemento antibiótico VCN (BBL, EUA), composto pelos antibióticos vancomicina (3 mg/L de meio), colistina (7,5 mg/L de meio) e nistatina (12.500 UI/L de meio) (OIE, 2009).

3.4.2.1 Cultivo microbiológico de amostras de urina

Um volume de 100 µL de cada amostra de urina foi semeado diretamente em placa de Petri, contendo o meio descrito no item 1.6, com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis e descartáveis. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37 °C durante 10 dias (OIE, 2009).

3.4.2.2 Cultivo microbiológico de amostras de *swab* vaginal

As amostras de *swab* vaginal coletadas em meio de transporte de Stuart foram semeadas em placa de Petri, contendo o meio descrito no item 1.6. As placas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia a 37 °C durante 10 dias (OIE, 2009).

3.4.2.3 Identificação bacteriana

Após o período de incubação de 10 dias, as placas de Petri semeadas foram verificadas quanto ao crescimento de colônias bacterianas, as quais foram identificadas. Foram considerados a forma e o aspecto macroscópico das colônias bacterianas isoladas, bem como suas características morfológicas e tintoriais pela coloração de Gram e microscopia óptica (ALTON et al., 1976). As colônias bacterianas com morfologia sugestiva do gênero *Brucella* (1 a 2 mm de diâmetro, coloração mel, translúcidas e claras, na forma de cocobastonetes pequenos e fracamente Gram negativos) foram coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, suspensas em 500µL de tampão TE e estocadas a -20 °C até serem submetidas à PCR para a identificação bacteriana.

3.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para a identificação das colônias bacterianas isoladas, bem como para a detecção direta de *Brucella* spp. nas amostras de *swab* vaginal e urina

A PCR foi realizada no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) situado no campus de Pirassununga, SP.

3.4.3.1 Extração de ácidos nucléicos de amostras clínicas e de colônias bacterianas

A extração e purificação de ácidos nucléicos das colônias bacterianas isoladas e das amostras clínicas foram realizadas utilizando-se protocolo baseado em digestão enzimática e purificação com solventes orgânicos, conforme descrito por Keid et al. (2007c).

3.4.3.2 Extração de ácidos nucléicos oriundas de colônias puras

O protocolo utilizado para a extração e purificação de ácidos nucléicos das colônias bacterianas morfológicamente compatíveis com *Brucella* spp. foi descrito abaixo:

1. descongelar em temperatura ambiente a suspensão de bactérias acondicionadas à temperatura de -20 °C;
2. homogeneizar e transferir um volume de 300 µL para um novo microtubo com capacidade de 1500 µL;
3. adicionar 200µL de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM, pH 8,0; dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%; proteinase K, 20mg/mL)
4. agitar por 10 segundos em vórtex;
5. incubar em termobloco (Thermomixer Comfort 5355 Eppendorf, Germany) à temperatura de 37 °C, *overnight*, sob agitação realizada durante 15 segundos a 1400 rpm, a cada 15 minutos;
6. adicionar 250 µL de clorofórmio e 250 µL de fenol equilibrado saturado pH 8,0;
7. agitar durante 10 segundos em vórtex;
8. centrifugar a 12.000 x g a 4 °C durante 5 minutos;

9. transferir 400 μL da fase aquosa para um novo microtubo com capacidade de 1500 μL , tomando-se o cuidado de não aspirar a interfase orgânica;
 10. adicionar igual volume de propanol puro;
 11. homogeneizar por inversão e acondicionar à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante uma hora;
 12. centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos;
 13. descartar o sobrenadante por inversão e adicionar 500 μL de etanol 70%;
 14. homogeneizar por inversão;
 15. centrifugar a 12.000 x g durante 20 minutos;
 16. descartar o sobrenadante por inversão;
 17. secar o sedimento em termobloco sem agitação à temperatura de $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos;
 18. adicionar 30 μL de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0);
 19. incubar em termobloco sem agitação à temperatura de $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
- Estocar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da reação de amplificação de ácidos nucléicos-

3.4.3.3 Extração de ácidos nucléicos de amostras de urina

1. Descongelar, em temperatura ambiente, as amostras de urina acondicionadas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frasco coletor universal;
2. homogeneizar e transferir um volume de 300 μL para um novo microtubo com capacidade de 1500 μL ;
3. seguir exatamente a partir do passo 3 descrito no item 1.7.1.1.

3.4.3.4 Extração de ácidos nucléicos de amostras de *swab* vaginal

1. Descongelar, em temperatura ambiente, as amostras de *swab* vaginal coletadas em tubos secos e acondicionadas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
2. ressuspender as amostras em 1 mL de tampão TE;

3. homogeneizar em vórtex durante 10 minutos;
4. transferir um volume de 300 µL para um novo microtubo com capacidade de 1500 µL;
5. seguir exatamente a partir do passo 3 descrito no item 1.7.1.1.

3.4.3.5 Reação de amplificação de ácidos nucléicos

A reação de amplificação de ácidos nucléicos foi realizada em duas etapas em todas as amostras de DNA extraídas, descritas no item 1.7.1. Na primeira etapa foi utilizado um ensaio gênero específico (PCR-ITS) baseado em oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) capazes de detectar qualquer componente do gênero *Brucella*. Amostras que apresentaram resultados positivos na primeira reação foram submetidas a uma segunda etapa de amplificação, na qual foram empregados *primers* específicos para a amplificação da estirpe vacinal B19 (PCR-B19).

3.4.3.6 Oligonucleotídios iniciadores (*primers*) empregados

Na PCR-ITS foram utilizados os *primers* ITS66 e ITS279, direcionados à região interespaçadora do RNA ribossomal de *Brucella* spp., os quais originam um produto amplificado de 214 pb para qualquer componente do gênero (KEID et al., 2007a).

A identificação da amostra vacinal B19 foi realizada empregando-se os *primers* ERI-F (BRICKER et al., 2003) e OLIGO-2 (SANGARI et al., 1994), direcionados ao gene *ery* de *Brucella* spp., responsável pela codificação da enzima D-eritrose-1-fosfato desidrogenase. O gene *ery* apresenta uma deleção de 702bp, específica da estirpe B19 de *Brucella abortus*. Os *primers* empregados hibridizam-se às regiões adjacentes à deleção, produzindo um fragmento de 296bp para a *B. abortus* B19. Para as demais espécies, biotipos e estirpes de *Brucella* o fragmento amplificado foi de 998bp. As sequências dos *primers* utilizados podem ser verificadas no quadro 1.

Quadro 1 - Seqüência dos *primers* direcionados à região interespaçadora (ITS) do gene codificador do RNA ribossomal e do gene *ery*, empregados respectivamente, para a detecção de *Brucella* spp. e da estirpe vacinal B19 - São Paulo – 2013

PRIMERS	SEQUÊNCIA
ITS66	5'ACA TAG ATC GCA GGC CAG TCA 3'
ITS279	5'AGA TAC CGA CGC AAA CGC TAC 3'
ERY-F	5' GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA 3'
OLIGO-2	5' CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3'

3.4.3.7 Condições de amplificação de ácidos nucléicos

Para ambas as reações de amplificação foi utilizado o termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems, Califórnia-USA).

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 50µL, contendo: 200 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), tampão de reação 10X (500mM KCl; 200mM Tris-HCl, pH 8.4), 0,5µM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂; 1,5 Unidades de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e água ultra pura.

A PCR-ITS foi realizada nas seguintes condições de amplificação: aquecimento inicial a 95 °C durante dois minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos, seguidos de aquecimento final a 72 °C durante 10 minutos.

A PCR-B19 foi realizada nas seguintes condições: aquecimento inicial a 95 °C durante dois minutos, 39 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundo, seguidos de aquecimento final a 72 °C durante dois minutos

3.4.3.8 Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8). O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm.

A imersão do gel numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 20 minutos e posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Estas foram comparadas com um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi calculada a especificidade diagnóstica de cada teste laboratorial considerando-se cada período de colheita, bem como o período total de monitoramento.

Considerou-se a especificidade diagnóstica dos testes laboratoriais sua capacidade em detectar como negativos os animais não infectados e vacinados contra brucelose com a vacina B19.

4 RESULTADOS

4.1 SOROLOGIA

Na avaliação da dinâmica da resposta humoral utilizando-se o teste do AAT, verificou-se que 100% dos animais vacinados apresentaram anticorpos aglutinantes sete dias pós-vacinação, tanto na propriedade A quanto na B.

Todos os animais permaneceram positivos pelo AAT até o D151 e D366 pós-vacinação nas propriedades A e B, respectivamente. Na propriedade A, a redução nos títulos de anticorpos aglutinantes detectados por este teste foi verificada a partir do D231 pós-vacinação, sendo mais acentuada a partir do D286. No D552 pós-vacinação, quatro fêmeas apresentaram resultado positivo pelo AAT, com um valor de especificidade de 69,23%. Na propriedade B, a redução dos títulos de anticorpos pelo AAT iniciou-se no 197º dia pós-vacinação. Na última avaliação realizada na propriedade B, no 366º dia pós-vacinação, sete das 11 bezerras apresentaram resultado positivo pelo AAT, resultando num valor de especificidade de 36,36%.

O teste de 2ME apresentou resultado positivo em 100% das bezerras vacinadas aos 14 dias pós-vacinação, tanto na propriedade A quanto na B.

Todos os animais permaneceram positivos pelo teste de 2ME até o D126 e D56 pós-vacinação nas propriedades A e B, respectivamente. Na propriedade A, a redução nos títulos de anticorpos aglutinantes detectados por este teste foi verificada a partir do D231 pós-vacinação, sendo mais acentuada a partir do D286. No D552 pós-vacinação, uma fêmeas apresentou resultado positivo pelo teste de 2ME, resultando num valor de especificidade de 92,31%. Na propriedade B, a redução dos títulos de anticorpos pelo 2ME iniciou-se no 105º dia pós-vacinação, sendo mais acentuada a partir do D197. Na última avaliação realizada na propriedade B, no 366º dia pós-vacinação, três das 11 bezerras apresentaram resultado positivo pelo teste de 2ME, resultando num valor de especificidade de 72,73%.

O número de bezerras bubalinas vacinadas detectadas como positivas no teste de FC aumentou gradativamente a partir do 7º dia pós-vacinação, nas duas propriedades avaliadas. Todas as fêmeas foram diagnosticadas como positivas aos 126 dias e 105 dias pós-

vacinação respectivamente, nas propriedades A e B. A partir deste período, houve declínio gradativo no número de animais positivos, até que todos apresentaram resultados negativos pelo TFC aos 552 e 331 dias pós-vacinação, respectivamente nas propriedades A e B.

Considerando-se os resultados obtidos pelo teste de PF, verificou-se que tanto na propriedade A quanto na propriedade B, a soroconversão iniciou-se aos 7 dias pós-vacinação, atingindo um número máximo de animais positivos aos 28 dias pós-vacinação. A partir deste momento, o número de animais positivos pelo teste de PF começou a declinar, de forma que todos se apresentaram negativos aos 151 e 232 dias pós-vacinação respectivamente nas propriedades A e B.

Os resultados obtidos nos quatro testes sorológicos empregados, bem como na PCR realizada em amostras de urina e *swab* vaginal, organizados por data de colheita nas propriedades A e B podem ser visualizados respectivamente nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultados positivos, totalidade dos resultados positivos, especificidade e especificidade total dos quatro testes sorológicos e das PCRs dos animais da propriedade A, divididos em grupos quanto a faixa etária e separados por coleta - São Paulo - 2013

(Continua)

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR <i>swab</i> vaginal	PCR urina
1	A	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/33	0/33
	B	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/33	0/33
	C	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/33	0/33
	D	0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/33	0/33
	E	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/33	0/33
	F	0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/33	0/33
Total positivos			0/33	0/33	0/33	0/33	0/33	0/33
Especificidade			100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,0%	100,00%
2	A	7	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	B	7	5/5	4/5	3/5	1/5	0/5	0/4
	C	7	10/10	10/10	7/10	2/10	0/10	0/8
	D	7	6/6	6/6	5/6	1/6	0/6	0/3

								(Continuação)
Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab vaginal	PCR urina
	E	7	5/5	5/5	2/5	1/5	0/5	0/3
	F	7	6/6	6/6	4/6	1/6	0/6	0/6
Total positivos			33/33	31/33	21/33	6/33	0/33	0/24
Especificidade			0,00%	6,06%	36,36%	81,82%		
3	A	14	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	B	14	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	0/1
	C	14	10/10	10/10	9/10	4/10	0/10	0/4
	D	14	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/4
	E	14	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	0/2
	F	14	6/6	6/6	6/6	2/6	0/6	0/6
Total positivos			33/33	33/33	31/33	11/33	0/33	0/18
Especificidade			0,00%	0,00%	6,06%	66,67%		
4	A	21	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	21	5/5	5/5	4/5	1/5	1/5	0/3
	C	21	10/10	10/10	9/10	5/10	0/10	1/8
	D	21	6/6	6/6	6/6	2/6	0/6	0/5
	E	21	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	1/4
	F	21	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/5
Total positivos			33/33	33/33	30/33	14/33	1/33	2/26
Especificidade			0,00%	0,00%	9,09%	57,58%		
5	A	28	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/0
	B	28	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/4
	C	28	10/10	10/10	10/10	4/10	0/10	0/7
	D	28	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/3
	E	28	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	0/2
	F	28	6/6	6/6	6/6	4/6	0/6	0/5
Total positivos			33/33	33/33	33/33	15/33	0/33	0/21
Especificidade			0,00%	0,00%	0,00%	54,55%		
6	A	59	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1

								(Continuação)
Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab vaginal	PCR urina
	B	59	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/2
	C	59	10/10	10/10	10/10	2/10	0/10	1/8
	D	59	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/4
	E	59	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/4
	F	59	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	0/6
Total positivos			33/33	33/33	33/33	8/33	0/33	1/25
Especificidade			0,00%	0,00%	0,00%	75,76%		
7	A	91	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	B	91	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	1/3
	C	91	9/9	9/9	9/9	0/9	2/9	0/9
	D	91	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/2
	E	91	4/4	4/4	4/4	2/4	0/4	0/3
	F	91	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5
Total positivos			28/28	28/28	28/28	4/28	2/28	1/23
Especificidade			0,00%	0,00%	0,00%	85,71%		
8	A	126	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	B	126	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	1/4
	C	126	10/10	10/10	9/10	0/10	0/10	1/8
	D	126	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/5
	E	126	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	F	126	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5
Total positivos			32/32	32/32	30/32	1/32	0/32	2/28
Especificidade			0,00%	0,00%	6,25%	96,88%		
9	A	151	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	151	5/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5
	C	151	10/10	8/10	7/10	0/10	0/10	0/9
	D	151	6/6	6/6	5/6	0/6	0/6	0/5
	E	151	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4

								(Continuação)
Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab vaginal	PCR urina
	F	151	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6
Total positivos			32/32	26/32	24/32	0/32	0/32	0/30
Especificidade			0,00%	18,75%	25,00%	100,00%		
10	A	231	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	231	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/4
	C	231	9/10	5/10	1/10	0/10	0/10	0/10
	D	231	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/5
	E	231	5/5	4/5	3/5	0/5	0/5	0/5
	F	231	6/6	6/6	2/6	0/6	0/6	0/6
Total positivos			26/33	17/33	7/33	0/33	0/33	0/31
Especificidade			21,21%	48,48%	78,79%	100,00%		
11	A	286	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	286	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C	286	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9
	D	286	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	E	286	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	1/5
	F	286	6/6	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Total positivos			18/33	9/33	0/33	0/33	0/33	2/32
Especificidade			45,45%	72,73%	100,00%	100,00%		
12	A	353	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	353	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4
	C	353	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	D	353	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	E	353	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	F	353	5/6	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Total positivos			15/33	3/33	1/33	0/33	0/33	0/32
Especificidade			54,55%	90,91%	96,97%	100,00%		
13	A	406	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	406	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4

(Continuação)

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab vaginal	PCR urina
	C	406	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	D	406	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	E	406	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	1/5
	F	406	5/6	1/6	1/6	0/6	0/6	1/6
Total positivos			15/32	3/32	1/32	0/32	0/32	2/31
Especificidade			53,13%	90,63%	96,88%	100,00%		
14	A	452	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	452	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C	452	2/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	D	452	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/5
	E	452	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/4
	F	452	6/6	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Total positivos			18/32	10/32	3/32	0/32	0/32	1/30
Especificidade			43,75%	68,75%	90,63%	100,00%		
15	A	494	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	B	494	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C	494	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	D	494	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	E	494	5/5	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5
	F	494	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Total positivos			13/31	4/31	2/31	0/31	0/31	0/31
Especificidade			58,06%	87,10%	93,55%	100,00%		
16	A	552	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	B	552	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	C	552	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	D	552	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	E	552	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	F	552	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	(Conclusão)	
							PCR swab vaginal	PCR urina
		Total positivos	4/13	1/13	0/13	0/13	0/13	0/13
		Especificidade	69,23%	92,31%	100,00%	100,00%		
TOTAL POSITIVOS			366/497	296/497	244/497	59/497	3/464	11/395
ESPECIFICIDADE TOTAL			26,36%	42,45%	50,91%	88,13%		
			131/497	211/497	253/497	438/497		

Tabela 3 - Resultados positivos, totalidade dos resultados positivos, especificidade e especificidade total dos quatro testes sorológicos e das PCRs dos animais da propriedade B, divididos em grupos quanto a faixa etária e separados por data de colheita - São Paulo – 2013

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	(Continua)	
							PCR swab	PCR urina
1	B	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	C	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
	F	0	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	Total positivos			0/11	0/11	0/11	0/11	0/11
Especificidade			100,00%	100,00%	100,00%	100,00%		
2	B	8	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
	C	8	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0
	D	8	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	8	6/6	6/6	0/6	5/6	0/6	0/5
	F	8	2/2	2/2	1/2	2/2	0/2	0/2
	Total positivos			11/11	11/11	1/11	9/11	0/11
Especificidade			0,00%	0,00%	90,91%	18,18%		
3	B	14	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
	C	14	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
	D	14	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	14	6/6	6/6	1/6	5/6	0/6	0/2

(Continuação)

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab	PCR urina
	F	14	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
	Total positivos		11/11	11/11	3/11	8/11	0/11	0/7
	Especificidade		0,00%	0,00%	81,82%	27,27%		
4	B	21	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/0
	C	21	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1
	D	21	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	21	6/6	6/6	3/6	5/6	1/6	1/5
	F	21	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2
	Total positivos			11/11	11/11	6/11	9/11	1/11
Especificidade			0,00%	0,00%	45,45%	18,18%		
5	B	28	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	C	28	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	D	28	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	28	6/6	6/6	5/6	5/6	0/6	0/5
	F	28	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
	Total positivos			11/11	11/11	9/11	8/11	0/11
Especificidade			0,00%	0,00%	18,18%	27,27%		
6	B	45	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	C	45	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	D	45	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	45	6/6	6/6	6/6	4/6	0/6	0/5
	F	45	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
	Total positivos			11/11	11/11	10/11	7/11	0/11
Especificidade			0,00%	0,00%	9,09%	36,36%		
7	B	56	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	C	56	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	D	56	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	E	56	6/6	6/6	5/6	4/6	0/6	1/4
	F	56	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
	Total positivos			11/11	11/11	10/11	7/11	0/11
Especificidade			0,00%	0,00%	9,09%	36,36%		

(Continuação)

Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab	PCR urina
		Total positivos	11/11	11/11	10/11	7/11	0/11	1/9
		Especificidade	0,00%	0,00%	9,09%	36,36%		
8	B	105	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	C	105	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1
	D	105	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1	0/0
	E	105	6/6	5/6	6/6	2/6	1/6	0/5
	F	105	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2
		Total positivos	11/11	10/11	11/11	3/11	1/11	0/9
		Especificidade	0,00%	9,09%	0,00%	72,73%		
9	B	136	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	136	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	136	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	136	6/6	5/6	2/6	1/6	0/6	0/4
	F	136	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/1
		Total positivos	11/11	9/11	4/11	1/11	0/11	0/8
		Especificidade	0,00%	18,18%	63,64%	90,91%		
10	B	164	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	164	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	164	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	164	6/6	5/6	0/6	1/6	0/6	0/5
	F	164	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
		Total positivos	11/11	7/11	1/11	1/11	0/11	0/9
		Especificidade	0,00%	36,36%	90,91%	90,91%		
11	B	197	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	197	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	D	197	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	197	6/6	2/5	1/6	1/6	0/6	0/2
	F	197	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2

								(Continuação)
Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab	PCR urina
		Total positivos	10/11	3/11	2/11	1/11	0/11	0/5
		Especificidade	9,09%	72,73%	81,82%	90,91%		
12	B	232	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	232	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	232	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	232	5/6	5/6	0/6	0/6	0/6	0/5
	F	232	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
		Total positivos	9/11	6/11	1/11	0/11	0/11	0/9
		Especificidade	18,18%	45,45%	90,91%	100,00%		
13	B	268	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	268	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	268	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	268	6/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/1
	F	268	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/1
		Total positivos	10/11	3/11	1/11	0/11	0/11	0/4
		Especificidade	9,09%	72,73%	90,91%	100,00%		
14	B	303	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	303	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
	D	303	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	303	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/3
	F	303	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
		Total positivos	8/11	1/11	1/11	0/11	1/11	0/7
		Especificidade	27,27%	90,91%	90,91%	100,00%		
15	B	331	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	331	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	D	331	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	E	331	5/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/3
	F	331	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2

								(Conclusão)
Coleta	Grupos	Dias pós vacinação	AAT	2ME	FC	PF	PCR swab	PCR urina
		Total positivos	8/11	2/11	0/11	0/11	0/11	0/8
		Especificidade	27,27%	81,82%	100,00%	100,00%		
16	B	366	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	C	366	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	D	366	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0
	E	366	5/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/5
	F	366	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/1
			Total positivos	7/11	3/11	0/11	0/11	0/11
		Especificidade	36,36%	72,73%	100,00%	100,00%		
TOTAL POSITIVOS			151/176	110/176	59/176	54/176	3/176	2/125
ESPECIFICIDADE TOTAL			14,20% (25/176)	37,50% (66/176)	66,48% (117/176)	69,32% (122/176)		

Os valores de especificidade dos testes sorológicos oscilaram ao longo do experimento em ambas as propriedades. A dinâmica humoral após a vacinação das bezerras bubalinas utilizando-se a estirpe B19, nas propriedades A e B pode ser observada nos gráficos 1 e 2, respectivamente, bem como os momentos em que eliminação da estirpe vacinal B19 foi evidenciada pela PCR, no decorrer das 16 colheitas.

Gráfico 1 - Dinâmica dos valores de especificidade dos quatro testes sorológicos ao longo do período pós-vacinal da propriedade A, juntamente com identificação pontual dos momentos em que ocorreram eliminações da cepa vacinal - São Paulo - 2013

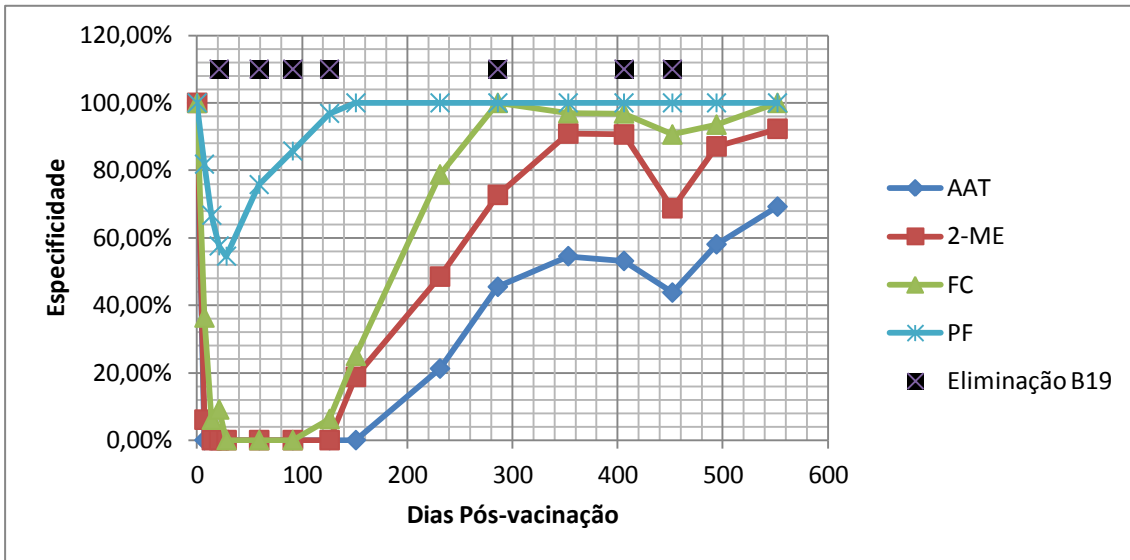
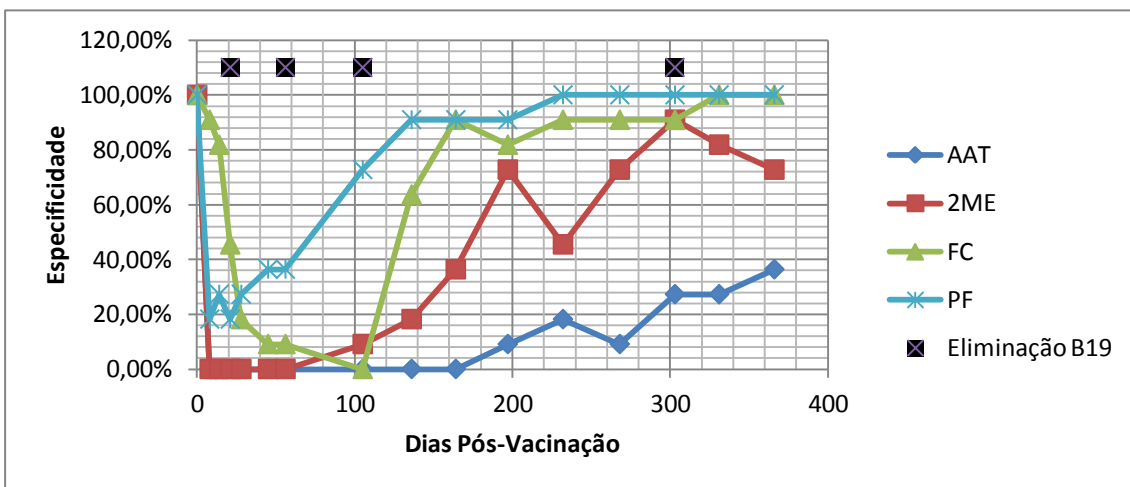


Gráfico 2 - Dinâmica dos valores de especificidade dos quatro testes sorológicos ao longo do período pós-vacinal da propriedade B, juntamente com a identificação pontual dos momentos em que ocorreram eliminações da cepa vacinal - São Paulo - 2013



4.2 CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Não foi verificado o isolamento de *Brucella* spp. a partir das 629 amostras de swab vaginal e 553 amostras de urina, oriundas de bezerras das duas propriedades.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Foram realizadas um total de 1144 PCR, sendo 629 reações executadas a partir de amostras de *swab* vaginal e 515 a partir de amostras de urina, com um total de 1,66% (19/1144) amostras positivas, das quais 0,95% (6/629) foram amostras de *swab* vaginal e 2,5% (13/515) de urina. Estas amostras apresentaram resultado positivo pela PCR-ITS e pela PCR-B19.

Do total de 44 animais avaliados 15 (34,1%) apresentaram resultado positivo pela PCR-B19 em amostras de urina e/ou pelo *swab* vaginal em pelo menos uma colheita. Dos 15 animais positivos, quatro (26,7%) apresentaram resultado positivo em dois momentos distintos ao longo do período de avaliação.

Os resultados descritos acima podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados positivos obtidos na PCR das amostras de *swab* vaginal e urina dos animais das propriedades A e B - São Paulo - 2013

Animal	Raça	Idade à vacinação (meses)	Idade à vacinação (dias)	Idade na colheita (meses)	Idade na colheita (dias)	Dias pós vacinação	PCR swab	PCR urina
640	Mediterrânea	7,83	236	11,37	341	105	+	-
642	Mediterrânea	7,73	233	8,47	254	21	-	+
650	Mediterrânea	7,43	224	8,17	245	21	+	-
657	Mediterrânea	5,40	163	9,33	280	56	-	+
3476	Murrah	8,00	241	15,53	466	303	+	-
3478	Murrah	7,73	233	17,30	519	286	-	+
3479	Murrah	7,50	226	21,30	639	406	-	+
3487	Murrah	6,63	200	8,23	247	21	-	+
3502	Murrah	5,97	180	21,73	652	452	-	+
3506	Murrah	5,77	174	6,70	201	21	-	+
3512	Murrah	5,63	170	15,53	466	286	-	+
3516	Murrah	5,77	174	8,83	265	91	+	-
3517	Murrah	5,63	170	9,87	296	126	-	+
3521	Murrah	5,40	163	8,47	254	91	+	-
3525	Murrah	5,37	162	7,37	221	59	-	+
		4,97	150	8,03	241	91	-	+
		4,63	140	5,37	161	21	+	-
				8,87	266	126	-	+

5 DISCUSSÃO

O presente projeto foi realizado em duas propriedades comerciais de criação de bubalinos leiteiros, com o objetivo foi realizar o monitoramento sorológico e microbiológico das bezerras vacinadas com a vacina B19 em intervalos regulares, desde o momento da vacinação até os animais atingirem 24 meses de idade, com a seguinte frequência: semanalmente durante o primeiro mês pós-vacinação (D0, D7, D14, D21 e D28) e mensalmente do primeiro mês pós-vacinação até a idade de 24 meses. Durante a execução do projeto, algumas dificuldades foram verificadas, as quais são mencionadas a seguir.

A primeira dificuldade verificada na realização do trabalho foi relacionada à obtenção de propriedades de criação de bubalinos negativas para brucelose, com manejo sanitário adequado e cujos proprietários concordassem com o monitoramento frequente durante um período de aproximadamente 18 meses.

Outro problema encontrado foi relacionado à manutenção dos intervalos mensais entre as colheitas de amostras, em razão da dificuldade de se conciliar as datas das colheitas mensais com o manejo das propriedades, de forma que o monitoramento foi realizado em intervalos não regulares.

Finalmente, algumas intercorrências levaram à heterogeneidade no número de animais amostrados em algumas colheitas. Alguns animais não estavam disponíveis para a avaliação em algumas visitas realizadas, por razões inerentes ao manejo realizado nas propriedades. Na propriedade A, o número de animais amostrados na última avaliação, realizada aos 552 dias pós-vacinação, foi reduzido, pois parte das fêmeas utilizadas no experimento havia sido comercializada pelo produtor. Na propriedade B, o monitoramento dos animais foi suspenso antes dos mesmos atingirem os 24 meses de idade, em razão da ocorrência de um foco de tuberculose no rebanho e o conseqüente sacrifício sanitário dos animais.

Com relação aos resultados obtidos na avaliação da cinética humoral das fêmeas bubalinas após a vacinação com a vacina B19, verificou-se que a precocidade na detecção de anticorpos aglutinantes pelo teste de AAT observada no presente trabalho corrobora com resultados descritos por outros autores que avaliaram a cinética humoral em bezerras bovinas (COCKS E DAVIES, 1973; SUTHERLAND et al., 1982; RIBEIRO et al., 1997; MATHIAS et al., 1998; SAMARTINO et al., 2000; AGUIRRE et al., 2002; KOLODA, 2005; FARIA, 2010) e

bubalinas vacinadas com a vacina B19 (JAMAL et al., 2003; CAPORALE et al., 2010; NARDI et al., 2012).

O declínio nos anticorpos aglutinantes detectados pelo teste do AAT iniciou entre nos dias 197 (propriedade B) e 231 (propriedade A) pós-vacinação, sendo mais acentuado a partir de 286 dias pós-vacinação. Aos 552 dias pós-vacinação, quatro fêmeas apresentaram resultado positivo pelo AAT, resultando num valor de especificidade de 69,23% na detecção de animais vacinados. As quatro búfalas detectadas como positivas aos 552 dias pós-vacinação apresentaram idades de 724 dias (24,13 meses), 749 dias (24,97 meses), 752 dias (25,07 meses) e 767 dias (25,57 meses) e foram vacinadas respectivamente aos 5,7; 6,53; 6,63 e 7,13 meses de idade.

O teste do 2ME apresentou resultado positivo em 100% das bezerras bubalinas aos 14 dias pós-vacinação, nas duas propriedades avaliadas, permanecendo positivas até os dias 126 e 56 pós-vacinação nas propriedades A e B, respectivamente. Na propriedade A, a redução no número de animais positivos detectados por este teste foi verificada a partir do D231 pós-vacinação, sendo mais acentuada a partir do D286. Na propriedade B, os animais começaram a apresentar resultados negativos num período mais precoce, aos 105 dias pós-vacinação.

O teste de 2ME apresentou maior especificidade diagnóstica, quando comparado com o teste de AAT aos 552 dias pós-vacinação. Neste momento, apenas um animal foi detectado como positivo pelo teste, na propriedade A. Este animal apresentava-se aos 25,57 meses de idade, tendo sido vacinado aos 7,13 meses de idade. Na última avaliação realizada na propriedade B, no 366º dia pós-vacinação, três das 11 bezerras apresentaram resultado positivo pelo teste de 2ME.

Os resultados oriundos do presente trabalho indicam a persistência de anticorpos vacinais detectados pelos testes de aglutinação numa porcentagem das bezerras aos 24 meses de idade. De acordo com o PNCEBT, a idade preconizada para a realização do diagnóstico sorológico em fêmeas bovinas e bubalinas que foram vacinadas com a vacina B19 entre os 3 e 8 meses de idade, é a partir dos 24 meses. Neste período, considera-se que houve um declínio nos títulos de anticorpos de origem vacinal a níveis não detectáveis pelos testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico da infecção.

Vários autores relataram redução no número de animais positivos, detectados pelos testes de AAT e 2ME mais precocemente em relação aos observados no presente trabalho bem

como a ausência de anticorpos vacinais aos 24 meses de idade em fêmeas bovinas (COCKS; DAVIES, 1973; SUTHERLAND et al., 1982; RIBEIRO et al. 1997; SAMARTINO et al., 2000; AGUIRRE et al., 2002; KOLODA et al., 2005) e bubalinas vacinadas com a vacina B19 entre 3 e 8 meses de idade (NARDI et al., 2012). Nestas publicações, resultados negativos nos testes de AAT e 2ME foram verificados entre 84 e 360 dias pós-vacinação em todas as fêmeas vacinadas.

À semelhança do observado no presente trabalho, a persistência de anticorpos vacinais em animais com idade superior a 24 meses, detectados pelos testes de aglutinação (AAT e 2ME) foi relatada por Alton et al. (1978); Mac Millan (1990); Samartino et al. (1999) e Herr et al. (1986).

Os testes de FC e de PF apresentaram-se mais eficientes na diferenciação de animais vacinados, já que todos os animais amostrados apresentaram resultados negativos na 16ª colheita, que correspondeu aos 552º dia pós-vacinação na propriedade A e 336º dia pós-vacinação na propriedade B.

O número de bezerras bubalinas vacinadas detectadas como positivas no teste de FC aumentou gradativamente a partir do 7º dia pós-vacinação. Todas as fêmeas foram diagnosticadas como positivas aos 126 dias e 105 dias pós-vacinação respectivamente, nas propriedades A e B. A partir deste período, houve declínio gradativo no número de animais positivos, até que todos apresentaram resultados negativos pelo TFC aos 552 e 331 dias pós-vacinação, respectivamente nas propriedades A e B.

Em bezerras bovinas vacinas com a estirpe B19, resultados negativos pelo teste de FC foram verificados em períodos anteriores aos relatados no presente trabalho, variando entre 120 e 196 dias pós-vacinação em bezerras bovinas (COCKS; DAVIS, 1973; CRAWFORD et al., 1990; SAMARTINO et al., 2000; FARIA, 2010). De acordo com Nardi et al. (2012), todas as bezerras bubalinas vacinadas apresentaram-se negativas pelo teste de FC a partir dos 270 dias pós-vacinação. Herr et al. (1986) e Mathias et al. (1998) verificaram a persistência de títulos vacinais à FC numa pequena porcentagem de fêmeas bovinas vacinadas na idade preconizada para a realização dos teste sorológicos.

Estes resultados indicam que os níveis de anticorpos fixadores de complemento declinam em períodos anteriores aos anticorpos aglutinantes, de forma que o teste de FC tende a apresentar maior especificidade na detecção de infecção por *Brucella* em animais vacinados (NICOLETTI et al., 1978; NIELSEN et al., 1998; DAJER et al., 1999; SAMARTINO et al., 1999)

O teste de PF foi o teste que apresentou o melhor desempenho dentre os quatro utilizados no experimento quanto à diferenciação dos animais vacinados. Tanto na propriedade A quanto na propriedade B, a soroconversão iniciou-se aos 7 dias pós-infecção, atingindo um número máximo de animais positivos aos 28 dias pós-vacinação. A partir deste momento, o número de animais positivos pelo teste de PF começou a declinar, de forma que todos se apresentaram negativos aos 151 e 232 dias pós-vacinação respectivamente nas propriedades A e B. Além disso, 16 animais não soroconverteram em nenhum momento do experimento, sendo 14 da propriedade A e 2 da B.

Estes resultados são próximos aos apresentados por Samartino et al. (1999), onde 98,6% das bezerras bovinas vacinadas com B19 encontravam-se negativas aos 242 dias pós-vacinais. Faria (2010) encontrou valores de especificidade de 93,55% aos 270 dias pós-vacinais.

Oscilações nos títulos de anticorpos detectados pelos testes de AAT, 2ME, FC e PF foram verificados em alguns animais ao longo do experimento. Na propriedade A, sete animais apresentaram oscilações nos títulos detectáveis pelo teste AAT, 10 pelo teste do 2ME, oito pela FC e um pelo teste de PF. Já na propriedade B, nenhum animal apresentou oscilação de títulos no teste de AAT e de PF, enquanto cinco bezerras apresentaram oscilações nos resultados do teste de 2ME e um animal no teste de FC. Resultados semelhantes foram verificados por Gonzalez et al (1978); Mathias et al. (1998) e Koloda (2005) em bezerras bovinas, e podem ser decorrentes de condições estressantes associadas ao manejo dos animais.

Com relação à avaliação da excreção da estirpe B19, verificou-se que a eliminação da mesma não foi evidenciada pelo cultivo microbiológico em amostras de urina ou *swab* vaginal em nenhuma das 44 fêmeas bubalinas monitoradas.

Alguns autores relataram o isolamento da estirpe B19 em fêmeas bovinas vacinadas a partir de amostras biológicas como leite, produtos de abortos e órgãos internos de bovinos vacinados. Meyer e Nelson (1969) detectaram cultura positiva durante um período superior a três anos no leite de fêmeas bovinas vacinadas com a B19 e Nielsen et al. (1988) isolaram a cepa B19 de *B. abortus* a partir de amostras de leite de vacas adultas, 12 meses após a vacinação.

Nas infecções naturais por *Brucella abortus* em bovinos, a eliminação de brucelas pela via vaginal em quantidades relevantes ocorre preferencialmente durante 15 dias após o

abortamento ou parto. Durante outros períodos do ciclo reprodutivo, a eliminação pode ocorrer de forma intermitente e em quantidades reduzidas, reduzindo a sensibilidade do cultivo microbiológico para o diagnóstico da infecção (PHILIPPON et al., 1970; NICOLETTI, 1980; VOELKEL et al., 1982; CRAWFORD et al., 1990; HERR et al., 1990).

Há escassos relatos na literatura científica referentes à utilização da PCR para a avaliação do *clearance* da estirpe B19 em bovinos e bubalinos vacinados. No presente projeto, das 1144 amostras testadas pela PCR, sendo 515 de urina e 629 de *swab* vaginal, apenas 19 foram detectadas como positivas pela PCR, das quais 13 foram amostras de urina e seis de *swab* vaginal. Considerando-se os 44 animais amostrados, 15 (34,09%) apresentaram pelo menos um resultado positivo durante o período de monitoramento.

Resultados positivos na PCR e negativos no cultivo microbiológico podem ser explicados pela maior sensibilidade apresentada pela PCR para detecção direta de *Brucella* spp. em amostras biológicas, quando comparada ao cultivo microbiológico. Resultados desta natureza foram evidenciados por outros autores ao aplicar estes testes laboratoriais ao diagnóstico da brucelose em diversas espécies animais e variados substratos biológicos. A maior da sensibilidade da PCR está geralmente relacionada à sua capacidade de detectar patógenos independentemente da sua viabilidade no material biológico, bem como à detecção de patógenos presentes em pequeno número nas amostras (BRICKER, 2002).

A porcentagem de resultados positivos detectados pela PCR foi inferior à detectada por Pacheco et al. (2012) ao realizar o monitoramento da excreção da estirpe vacinal em 14 fêmeas bovinas adultas, durante um ciclo reprodutivo completo (desde o momento da sincronização do cio até 30 dias após o parto), as quais foram vacinadas com a vacina B19 com idade entre 3 e 8 meses. Durante o monitoramento, foram colhidas amostras de leite e urina para o diagnóstico microbiológico e molecular. O isolamento de *Brucella* spp. foi negativo nas 420 amostras examinadas. Na PCR, 86 das 420 (20,05%) apresentaram resultado positivo, com amplificação de fragmento específico para a estirpe B19. As amostras de leite corresponderam a 5,7% (12/210) das amostras positivas e as amostras de urina a 35,2% (74/210) das amostras positivas. Todas as fêmeas avaliadas apresentaram pelo menos um resultado positivo durante o período de monitoramento.

A discrepância nos resultados obtidos pode estar relacionada a inúmeros fatores, dentre os quais podemos mencionar: (i) diferentes espécies de hospedeiros avaliadas; (ii) animais em

diferentes faixas etárias; (iii) distintos protocolos utilizados para extração e amplificação de ácidos nucléicos das amostras biológicas.

O potencial de contaminação ambiental e de transmissão da infecção pelos animais que apresentaram resultados positivos pela PCR em amostras de urina e/ou *swab* vaginal é controverso. Como mencionado anteriormente, resultados positivos pela PCR, mas negativos pelo cultivo microbiológico podem indicar a eliminação de bactérias não viáveis ou em pequeno número pelos animais amostrados. Desta forma, não foi possível determinar a relevância dos mesmos na disseminação da infecção para bovinos e outros animais presentes na propriedade.

Com relação à frequência de eliminação da estirpe vacinal, observou-se que a mesma ocorreu de forma intermitente ao longo do período de monitoramento. Em 11 dos 15 animais com resultados positivos pela PCR, a detecção da estirpe B19 de *Brucella* ocorreu num único momento durante o período de monitoramento, variando entre 21 e 406 dias pós-vacinação. Quatro búfalas eliminaram a cepa vacinal em dois momentos distintos, com intervalos entre os episódios de eliminação de 35, 105, 120 e 265 dias. Estes resultados sugerem que a B19 pode persistir no organismo do animal por períodos prolongados. A maioria das publicações científicas relacionadas à avaliação do *clearance* da estirpe B19 em bovinos e bubalinos vacinados mencionam que a mesma multiplica-se apenas por um curto período após a vacinação ocorrendo então o *clearance* da estirpe vacinal, de maneira que a mesma raramente persiste por períodos prolongados no organismo animal. É importante ressaltar que na maioria destes estudos a determinação do período de *clearance* foi baseada em métodos bacteriológicos (MINGLE et al., 1941; MANTHEI 1952). Na medida em que novas ferramentas diagnósticas são desenvolvidas, melhorando o desempenho do diagnóstico laboratorial de várias enfermidades infecciosas em termos de sensibilidade e especificidade, resultados distintos dos verificados anteriormente podem ser verificados e novas avaliações devem ser realizadas.

As colheitas de amostras de urina e *swab* vaginal foram realizadas semanalmente durante o primeiro mês de monitoramento e mensalmente do primeiro mês pós-vacinação até os animais atingirem a idade de 24 meses. O monitoramento em fêmeas bubalinas vacinadas com uma maior frequência poderia trazer maiores informações sobre a quantidade e viabilidade das bactérias excretadas bem como a periodicidade da excreção, com possibilidade de se estabelecer um perfil de eliminação mais preciso.

A vacinação é uma das estratégias mais importantes no contexto de um programa de controle da brucelose, especialmente em regiões de prevalências elevadas. A vacina B19 confere imunidade prolongada a 65 a 75% das fêmeas bovinas e bubalinas vacinadas, com a aplicação de uma única dose. As principais limitações relacionadas à vacina B19 são a impossibilidade de se utilizá-la na vacinação de animais adultos, a indução de resultados falsos positivos em testes sorológicos, a falta de inocuidade para bovinos e bubalinos machos e para o homem, a colonização de uma pequena porcentagem das fêmeas vacinadas e a excreção da estirpe vacinal numa porcentagem dos animais vacinados.

A B19 tem sido a vacina mais utilizada no mundo, sendo empregada no controle da brucelose em vários países que conseguiram reduzir a prevalência ou mesmo erradicar a infecção (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). As experiências destes países indicam que, apesar das limitações mencionadas acima, uma acentuada redução da prevalência pode ser obtida quando coberturas vacinais superiores a 80% são obtidas ao longo dos anos.

Estudos relacionados à persistência da estirpe vacinal no organismo de animais vacinados bem o desenvolvimento de testes sorológicos que permitam a diferenciação de anticorpos vacinais são desejáveis no contexto de uma campanha de controle da brucelose, especialmente em condições de baixa prevalência, quando medidas de erradicação, baseadas na vigilância e detecção de focos residuais devem ser implementadas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- a estirpe vacinal B19 é eliminada de forma intermitente e durante períodos prolongados nas bezerras bubalinas vacinadas entre 3 e 8 meses de idade.
- nas bezerras bubalinas vacinadas contra brucelose com a vacina B19, anticorpos aglutinantes foram detectados em animais com idade superior a 24 meses.
- os testes de fixação de complemento e polarização fluorescente apresentaram boa capacidade de diferenciação de títulos sorológicos vacinais.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: O.P.S., 2001. 398 p.
- AGUIRRE, N. P.; VANZINI V. R.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; VALENTINI, B. S.; DE LUCCA, G.; AUFRANC, C.; CANAL, A.; VIGLIOCCO, A.; NIELSEN, K. Antibody dynamics in Holstein Friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19, using seven serological tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry** v. 23, n. 4, p. 471-478, 2002.
- AL-NAKKAS, A. F.; WRIGHT, S. G.; MUSTAFA, A. S.; WILSON, S. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of human brucellosis in Kuwait. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, p. 397-403, 2002.
- AL-NAKKAS, A.; MUSTAFA, A. S.; WRIGHT, S. G. Large-scale evaluation of a single-tube nested PCR for the laboratory diagnosis of human brucellosis in Kuwait. **Journal Medical Microbiology**. v. 54, Pt 8, p. 727-730, 2005.
- ALTON, G. G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Austalian Veterinary Journal**, v. 54, p. 551-557, 1978.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: INRA, 1976. 109 p.
- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 57-63, 1975
- ALVES, A. J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BAHIENSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 6-13, 2009.
- AZEVEDO, S. S.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SOUZA, A. C.; VASCONCELLOS, S. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 19-26, 2009.
- 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.
- BRACEWELL C. D.; CORBEL, M. J. An association between arthritis and persistent serological reactions to *Brucella abortus* in cattle from apparently brucellosis-free herds. **Veterinary Record**, v. 106, p. 99, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução normativa nº 15**, de 19 de fevereiro de 2004. Brasília, DF: MAPA, 2004.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 2402, p. 1-12, 2002.

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.

CAPORALE, V.; BONFINI, B.; DI GIANNATALE, E.; DI PROVVIDO, A.; FORCELLA, S.; GIOVANNINI, A.; TITTARELLI, M.; SCACHIA, M. Efficacy of Brucella abortus vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine Brucella abortus strain 19 in water buffalo. **Veterinaria italiana**, v. 46, p. 13 - 19, 2010.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Elaboración y normalización de antígenos para las pruebas de sero-aglutinación de la brucelosis**. Ramos Mejía: Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, 1969. 21 p. (Nota Técnica n. 3, rev. 3).

ÇETINKAYA, B.; ONGOR, H.; MUZ, A.; ERTAS, H. B.; KALENDER, H.; ERDOGAN, H. M. Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. **Veterinary Record**. v. 144, n. 9, p. 239-240, 1999.

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

COCKS, E.; DAVIES, G. Brucella abortus (strain 19) vaccine: potency tests in cattle. **Journal of biological standardization**, v. 1, p. 171-178, 1973.

COLMENERO, J. D.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; MARIA REGUERA, J.; ANGEL SUAREZ-MUNOZ, M.; MARTIN-CARBALLINO, S.; MORATA, P. Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, p. 159-167, 2002.

CORBEL, M. J.; BRINLEY MORGAN, W. J. Genus brucella meyer and shaw 1920, 173AL. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G., (Editors), **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 377-390.

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 foetuses by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 7, p. 500-501, 2001.

CRASTA, O. R.; FOLKERTS, O.; FEI, Z.; MANE, S. P.; EVANS, C.; MARTINO-CATT, S.; et al. Genome Sequence of *Brucella abortus* Vaccine Strain S19 Compared to Virulent Strains Yields Candidate Virulence Genes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2193, 2008.

CRAWFORD, R. P.; HUBER, J. D.; ADAMS, B. S. Epidemiology and surveillance. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (Ed.). **Animal brucellosis**. Florida: CRC Press, Boca Raton, USA, 1990, p. 131–151.

DAHOUK, S. A. L.; TOMASO, H.; NÖCKLER, K.; NEUBAUER, H.; FRANGOULIDIS, D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. **Clinical Laboratory**, v. 49, p. 487-505, 2003.

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

DANKS, A. G. *Brucella abortus* strain 19 and orchitis in a bull. **Cornell Veterinarian**, v. 33, p. 381, 1943.

DAS, L. V. M.; PARANJAPE, V. L.; CORBEL, M. J. Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 60, n. 10, p. 1193-1194, 1990.

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

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

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

ELFAKI, M. G.; AL-HOKAIL, A.; NAKEEB, S. M.; AL-RABIAH, F. A. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for the diagnosis of brucellosis in humans. **Medical Science Monitor**, v. 27, p. MT69-74, 2005a.

ELFAKI, M. G.; UZ-ZAMAN, T.; AL-HOKAIL, A. A.; NAKEEB, S. M. Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, p.1-7, 2005b.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Bovine brucellosis. Health, diseases cards.** Disponível em: <<http://kids.fao.org/glipha/>>. Acesso em: 2006.

FARIA, G. C. **Avaliação do teste de polarização fluorescente para discriminar títulos sorológicos de bezerras vacinadas com amostra B19 de Brucella abortus.** 2010. 31 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, , 2010.

FEKETE, A.; BANTLE, 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.

FOSGATE, G. T., ADESIYUN, A. A.; HIRD, D. W.; JOHNSON, W. O.; HIETALA, S. K.; SCHURIG, G. G.; RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of Brucella infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 11, p. 1473 - 1608, 2002.

FOSTER, G.; MAC MILLAN, A. P.; GODFROID, J.; HOWIE, F.; ROSS, H. M. M; CLOECKAERT, A.; REID, R. J.; BREW, S.; PATTERSON, I. A.; A review of Brucella sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 563-580, 2002.

FUJII, T. U.; KASAI, N.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. L. P.; BARUSELLI, P. S.; NISHI, S. M.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M. Anticorpos anti-Neospora caninum e contra outros agents de abortamentos em búfalas da região do Vale do Ribeira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 5-9, 2001.

GALL, D.; NIELSEN, K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. **Revue Scientifique et Technique**, v. 23, n. 3, p. 989 - 1002, 2004.

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. 512-514, 1998.

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 of Veterinarian Research and Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GENTILE, A. Sulla brucellosi del bufali. **Veterinaria Italiana**, v. 18, p. 591-596, 1957.

GODFROID, J.; SCHOLZ, H. C.; BARBIER, T.; NICOLAS, C.; WATTIAU, P.; FRETIN, D.; WHATMORE, A. M.; CLOECKAERT, A.; BLASCO, J. M.; MORIYON, I.; SAEGERMAN, C.; MUMA, J. .; AL DAHOUKL, S.; NEUBAUER, H.; LETESSON, J. J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102 p. 118–131, 2011.

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

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

GUARINO, A.; SERPE, L.; FUSCO, G.; SCARAMUZZO, A.; GALLO, P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **Veterinary Record**, v. 147, n. 22, p. 634-636, 2000.

HAMDY, M.; AMIN, A. S. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. **Veterinary Journal**, v. 163, n. 3, p. 299-305, 2002.

HERR, S.; BRUGGE, L. A. T. Profiles of Serological Reactions Following Adult Cow Inoculation With Standard Dose *Brucella abortus* strain 19 Vaccine. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 56, n. 2, p. 93-96, 1985

HERR, S.; EHRET, W.J.; RIBEIRO, L. M. M.; CHAPARRO, F. The Persistence of Serological Reactions Following Heifer Vaccination With *Brucella Abortus*, Strain 19 on Brucellosis Free Farms. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 61, n. 1, p. 1113, 1990.

JAMAL, S. M.; AFZAL, M.; AHMED, S. The immune response of guinea pigs and buffalo calves to the locally prepared *Brucella abortus* strain 19 vaccine. **Revue scientifique et technique**, v. 22, n. 3, p. 893-897, 2003.

JONES, L. M.; MONTGOMERY, V.; WILSON, J. B. Characteristics of carbon dioxide-independent cultures of *Brucella abortus* isolated from cattle vaccinated with strain 19. **Journal of Infectious Diseases**, v. 115, p. 312-320, 1965.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; SALGADO, V. R.; MEGID, J.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. **Theriogenology**, v. 68, p. 1260-1270, 2007b.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VIEIRA, N. R.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, M.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S–23S rDNA interspacer. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.951–965, 2007a.

KEID, L. B.; SOARES, R. M.; VASCONCELLOS, S. A.; CHIEBAO, D. P.; MEGID, J.; SALGADO, V. R.; RICHTZENHAIN, L. J. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, p. 1203-1210, 2007c.

KING, N. B.; FRANK, N. A. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 131. n. 7, p. 100-1003, 1961.

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

KO, J.; SPLITTER, G. A. Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 65–78, 2003.

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

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

LAGE A, P.; ROXO, E.; MÜLLER, E. E.; POESTER, F.; CAVALLÉRO, J. C. M.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA P. M. P. C.; GONÇALVES, P. S. P. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 188 p.

LAMBERT, G.; MANTHEI, C. A.; DEYOE, B. L. Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v. 24, p. 1153–1157, 1963

LAMBERT, G.; DEYOE, B. L.; PAINTER, G. M. Postvaccinal persistence of *Brucella abortus* strain 19 in two bulls. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 145, p. 909, 1964.

LEAL-KLEVEZAS, D. S., MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, I. O., LÓPEZ-MERINO, A., MARTÍNEZ-SORIANO, J. P. Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995.

LEYLA, G.; KADRI, G.; UMRAN, O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 53-61, 2003.

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

MANTEROLA, L.; TEJERO-GARCES, A.; FICAPAL, A.; SHOPAYEVA, G.; BLASCO, J. M.; MARIN, C. M.; LOPEZ-GONI, I. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Veterinary Microbiology** v. 92, n. 1-2, p. 65-72, 2003.

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

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

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

MATAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDELNOOR, 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**, v. 34, n. 2, p. 477-478, 1996.

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

MATHIAS, L. A.; PINTO, A. A.; GONCALVES, E. I. Persistência de anticorpos aglutinantes e fixadores de complemento em bezerras vacinadas com *Brucella abortus* amostra B19. **Semina**. Londrina, v.5, n. 16, p. 40-43, 1998.

MCCAUGHEY, W. J.; PURCELL, D. A. Brucellosis in bull. **Veterinary Record**, v. 93, p. 336–337, 1973.

MEYER, M. E.; NELSON, C. J. Persistence of *Brucella abortus*, strain 19 infection in immunized cattle. **Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.**, v. 73, p. 159-165, 1969.

MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. **Standard laboratory techniques for brucellosis diagnosis**. New Haw: Central Veterinary Laboratory, 1991. 48 p.

MONTAGNARO, S.; LONGO, M.; MALLARDO, K.; PISANELLI, G.; DE MARTINO, L.; FUSCO, G.; BALDI, L.; PAGNINI, U.; IOVANE, G. Evaluation of a fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 125, p. 135-142, 2008.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; COLMENERO, J. D. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human Brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2443-2446, 1998.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; REGUERA, J. M.; GARCIA-ORDONEZ, M. A.; PICHARDO, C.; COLMENERO, J. D. Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4163-4166, 1999.

MORATA, P.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; REGUERA, J. M.; MIRALLES, F.; LOPEZ-GONZALEZ, J. J.; COLMENERO, J. D. Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3743-3746, 2001.

MOTTA, P. M. C.; LEITE, R. C.; LOPES, L. B.; AMARAL, F. R.; PREDO, P. E. F.; LAGE, A. P. Brucelose e tuberculose em oito rebanhos de núcleo de bubalinos de Luz das Dores do Indaíá. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2002, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte, 2002. p. 104.

NARDI JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M. G.; JORGE, A. M.; MEGID, J.; SILVA, L. M. P. Serological profile of buffalo (*Bubalus bubalis*) female calves vaccinated with standard *Brucella abortus* strain 19 vaccine using rose bengal, 2-mercaptoethanol and complement fixation tests. **Biologicals**, v. 40, p. 158-161, 2012.

NAVARRO, E.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ J. A.; SOLERA, J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. In human blood samples. **Immunology and Medical Microbiology** v. 1435, p. 1-5, 2002.

NAVARRO, E.; CASÃO, M. A.; SOLERA, J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. **Expert Review Molecular Diagnosis**, v. 4, n. 1, p. 115-23. 2004

NAVARRO, E.; FERNANDEZ, J. A.; ESCRIBANO, J.; SOLERA, J. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1654-1655, 1999.

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

NICOLETTI, P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 178, p. 143, 1981.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 24, p. 69–95, 1980.

NICOLETTI, P. Vaccination against *Brucella*. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 13, p. 147-168, 1990.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (Ed.). **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press. 1990. p. 284-299.

NICOLETTI, P.; JONES, L.M.; BERMAN, D. T. Adult vaccination with standard and reduced doses of *Brucella abortus* strain 19 vaccine in dairy herd infected with brucellosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 11, p. 1445-1449, 1978.

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

NIELSEN, K. et al. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 66, p. 321 - 329, 1998.

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

NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. Antibody response in adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* S19. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 19, p. 205-214, 1988.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; BERMUDEZ, R.; MORENO, F.; RENTERIA, T.; RUIZ, A.; APARICIO, L.; VAZQUEZ, S.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; SAMARTINO, L. E.; HALBERT, G.

Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. **Small ruminant research**, v. 56, p. 253-258, 2005

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L. E.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 80, p. 163-170, 2001.

NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; SMITH, P.; BOSSE, J.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. The use of divalent cation chelating agents (EDTA/EGTA) to reduce non specific serum protein interaction in enzyme immunoassay. **Veterinary Research Communications**, v. 18, p. 433-437, 1994.

NIMRI, L. F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, v. 28, p. 1-7, 2003.

OGASSAWARA, S.; CURY, R.; D'APICE, V. B.; MENDES, M. F. M.; ROCHA, U. F. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 36, p. 117-121, 1969.

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

OIE. Bovine Brucellosis. In: OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 2009. v. 1, chap. 2.4.3, p. 35, 2009.

PACHECO, W. A. **Excreção de *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas em diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com o ciclo reprodutivo**. São Paulo, 2007. 69 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 389-401, 2008.

PAULIN, L. M. S.; PRADO, G. E. S.; FEDERSONI, I. A. P.; TEIXEIRA, A. C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do instituto biológico**, v. 69, n. 4, p. 41-47, 2002.

PAULIN, L. M. S.; SAMARTINO, L. E.; CONDE, S. B.; FEDERSONI, I. S. P.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S. Fluorescent polarization assay, competitive enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1621-1626, 2012.

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

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

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

QUEIPO-ORTUÑO, M. I.; MORATA, P.; OCÓN, P.; MANCHADO, P.; COLMENERO, J. D. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2927-2930, 1997.

RANKIN, J. E. F. *Brucella abortus* in bull: a study of twelve naturally-infected cases. **Veterinary Record**, v. 77, p. 132-135, 1965.

RAY, W. C.; BROWN, R. R.; STRINGFELLOW, D. A.; SCHNURRENBERGER, P. R.; SCANLAN, C. M.; SWANN, A. I. Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 182-186, 1988.

RIBEIRO, M. G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; RATTI, J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com a amostra B19. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 49, n. 2, p. 137-150, 1997.

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

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 139-147, 2002.

RIJPENS, N. P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; ROSSAU, R.; HERMAN, L. M. F. Direct Detection of *Brucella* ssp. In Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n, 5, p. 1683-1688, 1996.

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

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. By PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 5, p. 3735-3737, 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**, v. 33, n. 12, p. 3198-3200, 1995.

SALGADO, V. R. **Avaliação das técnicas de cultivo microbiológico e soroaglutinação rápida em cartão com e sem o emprego de 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose canina**. 2006, 121 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 95-101, 1993.

SAMARTINO, L. E.; GREGORET, R. J.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. **Journal of Immunoassay**, v. 20, p. 115-120, 1999.

SAMARTINO, L. E.; GREGORET, R. J.; SIGAL, E. Field trial of brucellosis competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In: COLLING, A. (Ed.). **Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America**. Viena: international atomic energy agency, IAEA-TECDOC-1055, 1998. p. 163-167.

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

SAMARTINO, L.; GALL, D.; GREGORET, R.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 193-200, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGARI, F. J.; AGÜERO, J.; GARCÍA-LOBO, 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.; GARCÍA-LOBO, M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microbiology**, v. 146, p. 487-495, 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.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para "Brucella" em búfalos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 35-39, 1969.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E.; WHATMORE, A. M.; QUANCE, C. R.; KOYLASS, M. S.; CUMMINS, L. B.; DICK, E. J.; SNIDER, C. L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J. L.; NATHANIELSZ, P. W.; HUBBARD, G. B. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates—first report. **Journal of Medical Primatology**, v. 38, p. 70–73, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HOFER, E.; VERGNAUD, G.; LE FLECHE, P.; WHATMORE, A. M.; AL DAHOUK, S.; PFEFFER, M.; KRÜGER, M.; CLOECKAERT, A.; TOMASO, H.; Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower **Australia's Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, Pt. 2, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 801-108, 2010.

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

SERIKAWA, T.; MURAGUCHI, T. Significance of urine in transmission of canine brucellosis. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 41, n. 6, p. 607-616, 1979.

SERPE, L.; GALLO, P.; FIDANZA, N.; SCARAMUZZO, A.; FENIZIA, D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 313-317, 1999.

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

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

SPERRY, J. F. & ROBERTSON, D. C. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, p. 391 - 397, 1975b.

SREEVATSAN, S.; BOOKOUT, J. B.; RINGPIS, F.; PERUMAALLA, V. S.; FICHT, T. A.; ADAMS, L. G.; HAGIUS, S. D.; ELZER, P. H.; BRICKER, B. J.; KUMAR, G. K.; RAJASEKHAR, M.; ISLOOR, S.; BARATHUR, R. R. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or

Mycobacterium bovis infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2602-2610, 2000.

STUART, R. D. Transport Medium for specimens in Public Health Bacteriology. **Public Health Reports** v. 74, n. 5, p. 431-438, 1959.

SUTHERLAND, S. S.; ROBERTSON, A. G.; LE CRAS, D. V.; JOHNSTON, J. M.; EVANS, R. J. Serological response of cattle after vaccination and challenge with *Brucella abortus*. **Veterinary microbiology**, v. 7, n. 2, p. 165-175, 1982.

TANTILLO, G. M.; DI PINTO, A.; BUONAVOGLIA, C. Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 245-247, 2003.

TANTILLO, G. M.; DI PINTO, A.; VERGARA, A.; BUONAVOGLIA, C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 164-167, 2001.

TILLER, R. V.; GEE, J. E.; FRACE, M. A.; TAYLOR, T. K.; SETUBAL, J. C.; HOFFMASTER, A. R.; DE, B. K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, **Australia Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5837–5845, 2010.

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

USDA. UNITES STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis. Facts about brucellosis**. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em: 2010.

VIEIRA, N. R. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

WALLACH, J. C.; FERRERO, M. C.; VICTORIA DELPHINO, M.; FOSSATI, C. A.; BALDI, P. C. Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 8, p. 805-807, 2004.

WILESMITH, J. W. The persistence of *Brucella abortus* in calves: a retrospective study of heavily infected herds. **Veterinary Record**, v. 103, p. 149–153, 1978.

WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. **Veterinary Bulletin**, v. 45, p. 543-550, 1975.

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.

WYN-JONES, G.; BAKER, J. R.; JOHNSON, P. M. A clinical and immunological study of *Brucella abortus* strain 19-induced arthritis in cattle. **Veterinary Record**, v. 107, p. 5-9, 1980.

ZERVA, L.; BOURANTAS, K.; MITKA, S.; KANSOUZIDOU, A.; LEGAKIS, N. J. Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1661-1664, 2001.