



**Universidade Federal do Pará
Instituto de Medicina Veterinária
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Melina Garcia Saraiva de Sousa

Infecção por *Brucella abortus* em búfalas (*Bubalus bubalis*)

**Belém
2016**

Melina Garcia Saraiva de Sousa

Infeção por *Brucella abortus* em búfalas (*Bubalus bubalis*)

Defesa de Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Instituto de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Sanidade Animal.
Orientador Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

**Belém
2016**

Melina Garcia Saraiva de Sousa

Infecção por *Brucella abortus* em búfalas (*Bubalus bubalis*)

Defesa de Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Instituto de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto
Universidade Federal do Pará - UFPA
Orientador

Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani
Universidade Federal do Pará - UFPA
Co-orientador

Prof. Dr. Carlos Magno Chaves Oliveira
Universidade Federal do Pará – UFPA
Membro titular interno

Prof^a. Dr^a. Marilene de Farias Brito
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro -
UFRRJ
Membro titular externo

Prof^a. Dr^a. Natália da Silva e Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA
Membro titular externo

À minha filha, Júlia,
com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida.

À minha mãe, Ilda, que sempre acreditou e me ensinou a valorizar o trabalho e o estudo.

Aos meus avós, Brígida e Francisco, sempre presentes quando precisei.

Ao meu marido, Júnior Nobre, por me apoiar em todas as minhas iniciativas e conquistas.

À minha filha, Júlia, que mesmo pequena soube entender quando a mamãe precisava estudar enquanto ela queria brincar.

Aos meus irmãos Janaína e César, os melhores irmãos do mundo.

Ao meu orientador, José Diomedes Barbosa, pelas oportunidades de aprender e crescer na medicina veterinária, e pela confiança depositada em mim.

Ao professor Carlos Tokarnia, um mestre que me ensinou que os detalhes mínimos são muito importantes na construção de um belo trabalho.

Ao meu co-orientador Felipe Salvarani, pelas orientações dadas em tempo oportuno.

Aos professores da Universidade Federal do Pará (UFPA), pelas aulas ministradas e conhecimentos compartilhados.

À professora Marilene Brito, pela grande ajuda durante todo o processo de experimento e escrita, auxiliando em tudo.

Ao Setor de Anatomia Patológica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela parceria sempre na histopatologia.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Henrique Bomjardim, Alessandra Belo, Marcelo Vinhote, Marcel Passos, André Gibson, Nayra Freitas, Luiz Henrique, Danillo Henrique, Natália Silva, Taty Teles e Alcides Sarmiento, pela grande ajuda durante todo o experimento.

Ao Dr. Antônio Fonseca Júnior e Ingrid Preis, do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), pela recepção, orientação e análises de PCR.

Ao amigo Jefferson Pinto, da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ), por auxiliar no acesso aos matadouros para coleta de material.

Enfim, agradeço a todos que participaram para a realização deste trabalho.

“As pessoas se esquecem do que ouvem;
lembram do que lêem;
porém, só aprendem, de fato,
aquilo que fazem.”

Adão Roberto da Silva

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Brucella abortus* e as lesões causadas por esse agente nos anexos fetais, nos fetos e linfonodos de búfalas brucélicas gestantes. Para isso, 20 búfalas nos diferentes meses de gestação, sorologicamente positivas para brucelose, foram submetidas ao abate sanitário. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos associados à mensuração dos fetos durante a necropsia. Do útero fechado desses animais foram coletadas amostras para histopatologia e reação em cadeia da polimerase em tempo real, além de fragmentos de diversos linfonodos. A partir do segundo mês de gestação foi possível detectar a presença de DNA de *B. abortus* em líquido amniótico, líquido alantoide e em útero e, a partir do quinto mês, na placenta, coração, baço, rim, pulmão, intestino, fígado e linfonodos dos fetos. Os principais achados anatomopatológicos foram placentite fibrinopurulenta necrótica e endometrite supurativa crônica. A detecção de DNA de *B. abortus* nos linfonodos das búfalas avaliadas foi verificada a partir do quarto mês de gestação em sete búfalas e em uma búfala pós-parição. Os achados histológicos foram linfadenite aguda a crônica. A presença de DNA de *B. abortus* foi detectada em todos os grupos de linfonodos avaliados, sendo que os linfonodos mais acometidos foram os mamários. A transmissão intrauterina a partir do segundo mês de gestação representa uma rota importante de infecção na cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos.

Palavras-chave: Brucelose, búfalos, infecção transplacentária, linfonodos.

ABSTRACT

The objective of this study was to detect *Brucella abortus* and injuries caused by the bacteria in fetal membranes and fetuses, and in lymph nodes of buffaloes as well as to describe the lesions caused. Twenty buffaloes serologically positive for brucellosis were used and subjected to stamping for collection of material from the closed uterus of several months gestation. Fragments of lymph nodes were collected. Fetal age was determined by ultrasound examination and the size of fetuses was measured at necropsy. The samples were subjected to histopathology and qPCR. From the second month of pregnancy on it was possible to detect the presence of *B. abortus* DNA in amniotic fluid, allantoic liquid and uterus, and from the fifth month on in placenta, heart, spleen, kidney, lung, intestine, liver and lymph nodes of the fetuses. The main pathological findings were fibrinous suppurative necrotic placentitis, and chronic endometritis. The detection of *B. abortus* DNA in the lymph nodes was checked from the fourth month of pregnancy in seven buffaloes and in a post-calving buffalo. Acute to chronic lymphadenitis was histologically diagnosed. *B. abortus* DNA was detected in all evaluated groups of lymph nodes; the mammary lymph nodes were the most affected.

Key-words: Brucellosis, buffalo, transplacental infection, lymph nodes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. CAPÍTULO I: BRUCELOSE BUBALINA	13
3.1. HISTÓRICO DA BRUCELOSE	13
3.2. ETIOLOGIA	15
3.3. EPIDEMIOLOGIA	16
3.4. PATOGENIA	18
3.5. SINAIS CLÍNICOS	19
3.6. PATOLOGIA	19
3.6.1. Achados macroscópicos	19
3.6.2. Achados microscópicos	20
3.7. DIAGNÓSTICO	20
3.8. CONTROLE E PROFILAXIA	21
4. REFERÊNCIAS	24
5. CAPÍTULO II: INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA E INTRAUTERINA POR <i>Brucella abortus</i> EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>)	35
ABSTRACT.....	35
RESUMO	36
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	43
6. CAPÍTULO III: DETECÇÃO DE <i>Brucella abortus</i> EM LINFONODOS DE BÚFALAS (<i>Bubalus bubalis</i>) EM DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO	51
ABSTRACT.....	51
RESUMO	52
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53

RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
7. CONCLUSÕES	64

1. INTRODUÇÃO

A domesticação do búfalo (*Bubalus bubalis*) ocorreu em 2500 e 1400 a.C., particularmente na Índia e na China. Desde então, a criação de bubalinos espalhou-se pelo mundo, gerando fontes de alimento de alto valor biológico, como leite e carne, e força de trabalho, principalmente para populações de países pobres e em desenvolvimento (COCKRILL, 1984). No Brasil, sua introdução ocorreu em 1895, com animais da raça Mediterrâneo, provenientes da Itália, na Ilha de Marajó, estado do Pará, através do criador Vicente Chermont de Miranda. A partir daí, iniciaram-se várias importações de lotes de búfalos para diversas regiões brasileiras. Atualmente, a Amazônia agrupa as raças Mediterrânea, Murrah, Jaffarabadi e Carabao, além do tipo Baio (MOURA CARVALHO; LOURENÇO JUNIOR; TEIXEIRA NETO, 1997).

A população de búfalos no mundo supera os 168 milhões de animais, distribuídos geograficamente na seguinte proporção, 161 milhões na Ásia (95,83%), 3.717 milhões na África, principalmente no Egito (2,24%), 3.3 milhões (1,96 %) na América do Sul, 40.000 na Austrália (0,02 %) e 500.000 na Europa (0,30%) (BORGHESE, 2005).

O Brasil possui em torno de 1.277.199 bubalinos, e em especial a região Norte, possui 820 mil animais, sendo a maior produtora do País, com destaque para o estado do Pará, que responde por 37,9% do rebanho nacional (IBGE, 2014). Estudos realizados na região Amazônica sugerem que os bubalinos são mais adaptados a diversas condições ambientais que os bovinos (COSTA et al., 1992).

Dentre as zoonoses que afetam os bubalinos, destaca-se a brucelose, que é uma enfermidade infectocontagiosa de evolução geralmente crônica e caráter granulomatoso, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella* (CHEVILLE et al., 1993; XAVIER et al., 2009). O principal agente para bubalinos é *Brucella abortus* biotipo 1 (FOSGATE et al., 2002; MEGID et al., 2005).

Esta enfermidade vem provocando grandes prejuízos econômicos devido a problemas reprodutivos acarretados pela doença, como redução da fertilidade, nascimento de bezerros fracos e frequentemente ocasionando aborto (CORBEL, 1997). Além de provocar aborto, a brucelose causa placentite necrótica fibrinopurulenta (PAYNE, 1959; PALMER; CHEVILLE; JENSEN, 1996; PÉREZ et al., 1998; XAVIER et al., 2009; SOUSA et al., 2015a).

A brucelose tem sido diagnosticada em búfalos no Egito (MENSHAWY et al., 2014), em Trinidad e Tobago (FOSGATE et al., 2002), no Paquistão (NASIR et al., 2004) e no Brasil (OGASSAWARA et al., 1969; SANTA ROSA; CASTRO; TROISE, 1969; BASTIANETTO et al., 2005; SILVA; FONSECA; BARBOSA, 2014). Porém, não se sabe qual o momento da gestação que o útero, o feto, os anexos fetais e outros tecidos são colonizados pela bactéria.

Portanto, este estudo visa verificar a presença de *B. abortus* nos fetos, anexos fetais e linfonodos de búfalas sorologicamente positivas para brucelose, em diversos estágios de gestação, além de caracterizar as lesões anatomopatológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a presença de *B. abortus* nos fetos, anexos fetais e linfonodos de búfalas sorologicamente positivas para brucelose, em diversos estágios de gestação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as lesões histológicas causadas por *B. abortus* nos anexos fetais e no feto de bubalinos;
- Verificar a presença de *B. abortus* nos linfonodos de búfalas;
- Caracterizar as lesões anatomopatológicas causadas por *B. abortus* nos linfonodos de búfalas, em diversos estágios de gestação.

3. CAPÍTULO I: BRUCELOSE BUBALINA

3.1. HISTÓRICO DA BRUCELOSE

Em 1751, Cleghorn, cirurgião do exército britânico servindo na Ilha de Minorca, Espanha, descreveu casos de uma doença com sinais semelhantes aos citados por Hipócrates no ano 460 a.C. Porém, foi Marston, também cirurgião do exército britânico, em 1859, quem caracterizou a doença como entidade nosológica autônoma, quando contraiu brucelose na Ilha de Malta, situada ao sul da Sicília, Itália, e relatou, pela primeira vez, uma “febre gástrica renitente” como principal sintoma da doença (EVANS, 1950).

Em 09 de julho de 1887, o médico do exército britânico David Bruce, também na Ilha de Malta, durante as guerras napoleônicas, isolou o organismo específico responsável pela doença conhecida como febre de Malta (ou febre do Mediterrâneo ou ondulante), do baço de uma vítima, passando a provar a causa da doença através do isolamento de culturas esplênicas de outros sete casos fatais, e por experiências com animais. Em 1893 Bruce nomeou o organismo como *Micrococcus melitensis* do nome romano de Malta, Melita (a Ilha do mel). Em 1905, o Dr. Zammit, incriminou com sucesso a cabra Maltês como o hospedeiro animal de *M. melitensis*, por sua descoberta de que o sangue de cabras reagia experimentalmente a Febre de Malta usando seu teste de aglutinação e pelo isolamento de *M. melitensis* em cultura pura a partir do sangue de cabras. Posteriormente o Dr. Horrocks, confirmou que *M. melitensis* estava presente no leite de cabras infectadas. Em 1906, o tenente-coronel Birt e o Dr. Strachan ambos relataram que tinham encontrado a febre de Malta na África do Sul e que o leite de cabra foi muito usado no distrito, e em 1909 eles atualizaram seu relatório confirmando a presença da febre de Malta entre as cabras da África do Sul. Coronel Bruce, durante seu trabalho em Uganda em 1909, investigou o local e a doença de Muhinyo, provando ser a febre de Malta. Também houve relatos da doença em Gibraltar, na Colônia Britânica do Rio Orange, no Rio Nilo Azul na África e no Sudão (VASSALLO, 1992).

Em 1914, o Major Crawford Kennedy chamou a atenção para a possibilidade de uma infecção por *M. melitensis* em vacas na Inglaterra. Posteriormente descobriu que o leite e soro de certas vacas aparentemente saudáveis aglutinaram *M. melitensis*, e esta aglutinação já tinha sido relatada pelo Major Horrocks em Gibraltar. Pesquisas posteriores, especialmente depois da Primeira Guerra Mundial, esclareceram a relação do aborto contagioso dos bovinos com a Febre de Malta, com a compreensão de que o organismo causador, *Bacillus abortus*, isolado

em dezembro de 1895 pelo Dr. Benhard Bang, um excelente patologista veterinário dinamarquês e bacteriologista, era na verdade uma cepa distinta (VASSALLO, 1992).

Em 1918, a médica Alice Evans identificou, pela primeira vez, a brucelose em humanos nos EUA, informando haver relação íntima de *Bacillus abortus* com *Micrococcus melitensis*, concluindo que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e humanos eram similares e que *Micrococcus melitensis* era, na verdade, um bacilo, e não um coco como originalmente descrito. Também sugeriu que a doença passasse a se chamar brucelose, em homenagem a Bruce. Dois anos depois, Meyer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* (PACHECO; MELLO, 1956). Isto levou a renomeação para *Brucella abortus*. Um editorial feito pelo coronel William Horrocks em 1938, analisou os resultados de investigações epidemiológicas na França, descrevendo as diferenças entre as cepas de *Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, responsáveis pela febre ondulante em bovinos, caprinos e suínos (VASSALLO, 1992). O primeiro relato de isolamento de brucelose em leite de búfala foi realizado em 1948 no município de Cairo, no Egito (GENTILE, 1957).

Em 1895, no Brasil, os búfalos eram introduzidos no país, pela Ilha de Marajó, importados da Austrália, do Egito, da Índia, da Itália e de países do sudoeste asiático. Na Ilha de Marajó, os bubalinos encontraram condições ótimas para sua adaptação. Nas décadas seguintes foram introduzidos nas demais regiões do país, particularmente as que apresentam clima quente e úmido (JORGE, 2005).

No Brasil, o primeiro relato de brucelose em búfalos foi em 1969, diagnosticado por meio do teste de soroaglutinação rápida em placa, no qual encontraram 40,9% (27/66) dos búfalos reatores ao teste (SANTA ROSA; CASTRO; TROISE, 1969). No entanto, o primeiro isolamento em búfalas adultas no Brasil foi estabelecido por Ogassawara et al. (1969) do conteúdo de um higroma articular. Posteriormente, outros trabalhos evidenciaram a presença de brucelose nessa espécie, por meio de testes sorológicos (COSTA; CURY; ROCHA, 1973; LÁU; SINGH, 1985; BASTIANETTO et al., 2005; SILVA; FONSECA; BARBOSA, 2014; SOUSA et al, 2015ab).

Pelo mundo, a infecção por *B. abortus* em bubalinos tem sido relatada na Itália, por meio do diagnóstico por ELISA indireto (GUARINO et al., 2001). Em Trinidad e Tobago, por testes sorológicos em 1998 e por cultura bacteriológica em 1999 (FOSGATE et al., 2002). No Paquistão, em búfalos de explorações pecuárias privadas (NASIR et al., 2004). No Egito, estudo recente demonstrou a presença de estirpes de *B. suis* e *B. abortus*, identificadas por meio da reação em cadeia da polimerase em ruminantes domésticos, incluindo os bubalinos (MENSHAWY et al., 2014).

Recentemente, estudos demonstraram a detecção de *B. abortus* a partir do segundo mês de gestação no líquido amniótico, líquido alantoide e útero de búfalas sorologicamente positivas, e a partir do quinto mês de gestação nos tecidos fetais de bubalinos, por meio da PCR em tempo real (SOUSA et al., 2015a).

3.2. ETIOLOGIA

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa de evolução geralmente crônica e de caráter granulomatoso, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella* (FOSGATE et al., 2002). Microbiologicamente, as brucelas se apresentam como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, desprovidos de cápsulas e não formadores de esporos (NILSEN et al., 2004). Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificados como microrganismos catalase e oxidase-positivos, não fermentadores da lactose (PAULIN, 2003), urease-positivos (reação em poucos minutos) e indol-negativos (QUINN et al., 2005).

As brucelas podem ser divididas em dois grupos antigênicos distintos, de acordo com a presença ou ausência do antígeno O de superfície, as lisas ou clássicas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, e as rugosas *B. ovis* e *B. canis*. Cada espécie de *Brucella* apresenta um hospedeiro preferencial, *B. abortus* é o principal agente etiológico da brucelose em bovinos e bubalinos, *B. melitensis* acomete ovinos e caprinos e infecções severas em humanos (OSTERMAN; MORIYON, 2006), *B. suis* acomete principalmente suínos (HUDDLESON, 1931), *B. neotomae* foi isolada de roedores silvestres da espécie *Neotoma lepida* (STOENNER; LACKMAN, 1957), *B. ovis* é responsável pela epididimite em ovinos (BUDDLE, 1956) e *B. canis* pela brucelose canina (CARMICHAEL; BRUNER, 1968).

Algumas espécies foram descritas recentemente, isoladas de mamíferos marinhos da ordem dos cetáceos e pinípedes, *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, respectivamente (FOSTER et al., 2007), a espécie *B. microti*, isolada do roedor *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008) e de raposas *Vulpes vulpes* (SCHOLZ et al., 2009) e *B. inopinata*, isolada de humanos, contudo não foi identificado o reservatório animal (SCHOLZ et al., 2010). Recentemente, uma nova estirpe foi identificada, *B. papionis*, isolada de primatas *Papio* spp. (WHATMORE et al., 2014).

Algumas brucelas são subdivididas em biovars ou biótipos, sete para *B. abortus* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), três para *B. melitensis* (1, 2 e 3) e cinco para *B. suis* (1, 2, 3, 4 e 5) (MORENO; CLOECKAERT; MORIYÓN, 2002).

3.3. EPIDEMIOLOGIA

São poucos os relatos que descrevem os biovars mais frequentes da brucelose em búfalos, *B. abortus* biovar 1 foi relatado em búfalos na Índia (RENUKARADHYA; ISLOOR; RAJASEKHAR, 2002), na Itália (FAO/WHO, 1986; BORRIELLO et al., 2013; GAROFOLO et al., 2015), em Trinidad (FOSGATE et al., 2002), enquanto que o biovar 3 foi isolado em uma área do Mediterrâneo Oriental (FAO/WHO, 1986) e no sul da Itália (BORRIELLO et al., 2013). No Brasil, o primeiro relato do biovar 1 em búfalos, foi descrito por Megid et al. (2005), em um feto abortado em torno de seis a sete meses de gestação. Recentemente, foi isolado na Argentina, *B. abortus* biovar 5, proveniente de um feto abortado de bubalino, constituindo o primeiro relato desse biovar na espécie (MARTÍNEZ et al., 2014).

A epidemiologia da infecção por *Brucella* não foi extensivamente estudado em bubalinos, no entanto, bezerros nascidos de fêmeas bubalinas soropositivas em uma propriedade infectada são mais propensos a tornarem-se soropositivos quando comparados a bezerros nascidos de mães soronegativas (AKHTAR & MIRZA, 1995). E a concentração de muitos búfalos em uma pequena área facilita a transmissão da doença, podendo ser um fator importante para a propagação da brucelose (POLDING, 1947). Algumas características comportamentais dos bubalinos, como por exemplo, o fato de possuir o hábito de se banhar em aguadas e açudes, torna-os mais expostos a determinados microrganismos, como *Brucella* (WRAY, 1975). Podendo também ocorrer transmissão da doença a longa distância, devido à capacidade do microrganismo em sobreviver por semanas ou meses em água, urina, fezes, solo úmido, estrume, em condições favoráveis (BORRIELLO et al., 2013).

A principal fonte de infecção se dá através do trato digestivo pelo contato direto com restos placentários ou feto abortado (ACKERMANN; CHEVILLE; DEYEOE, 1988). A transmissão intrauterina é uma importante rota de infecção na cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos (SOUSA et al., 2015a). Outras vias de infecção incluem a contaminação através do leite (WILESMITH, 1978; NICOLETTI, 1980) e a inseminação artificial com sêmen contaminado (RANKIN, 1965).

A brucelose apresenta distribuição mundial, sendo que alguns países da Europa e América do Norte erradicaram a doença e passaram a impor restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos (GARCIA-CARRILLO, 1990; FAO, 1997; CAMPANÃ; GOTARDO; ISHIZUCA, 2003).

Estudos experimentais com a inoculação intraconjuntival da cepa de *B. abortus* 1969D, sugerem que os bubalinos são mais resistentes do que bovinos à infecção por *B.*

abortus (ADESIYUN et al., 2010). Outros estudos também fornecem evidências sugerindo que *B. abortus* isolada de bubalinos em Trinidad têm menor virulência em comparação com o gado, sendo assim, os bubalinos pareceram ser mais resistentes à infecção do que os bovinos, e tendem a ser infectados com estirpes de menor virulência (ADESIYUN et al., 2011).

No Paquistão, as explorações pecuárias privadas apresentam uma elevada percentagem de bubalinos soropositivos, os quais enfrentam grandes problemas, devido à ampla distribuição e alta prevalência da brucelose, pois frequentemente são introduzidos animais novos nas propriedades sem a realização de testes de diagnóstico, além da alta incidência de abortos (NASIR et al., 2004).

Na região Nordeste da Argentina, estudo realizado observou prevalência de 6,4% de bubalinos positivos para brucelose, por meio do teste de Polarização Fluorescente (KONRAD et al., 2013).

No Brasil, a prevalência da brucelose em rebanhos bubalinos vem sendo relatada por Costa, Cury e Rocha (1973) que examinaram 199 soros de búfalos, utilizando o teste de aglutinação em placa, verificaram 20,6% de animais positivos, no estado de Goiás. Sandoval et al. (1979) examinaram 992 soros provenientes de rebanhos bubalinos e encontraram prevalência de 4,33% e 5,69% para brucelose através das provas de soroaglutinação rápida e card test, respectivamente, no estado de São Paulo. Mathias et al. (1998) examinaram 462 animais oriundos de 16 rebanhos localizados em 7 municípios, através do teste de Fixação do Complemento, e verificaram prevalência de 10,39%, na Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Bastianetto et al. (2005) relataram prevalência de 0 (zero) a 37,5% de animais positivos para brucelose, fêmeas adultas, por meio dos testes do Antígeno Acidificado Tamponado (Card Test) e confirmados pelos testes de Soroaglutinação Lenta e 2-Mercaptoetanol, na região do Alto São Francisco, estado de Minas Gerais. Chaves et al. (2012) relataram prevalência de 5,18% para brucelose bubalina, por meio do teste do Antígeno Acidificado Tamponado, 2-Mercaptoetanol e soroaglutinação lenta em tubos, no estado do Maranhão. Recentemente, Silva, Fonseca e Barbosa (2014) observaram prevalência de 3,67% (176/4796) de bubalinos positivos ao teste 2-mercaptoetanol (2-ME), no estado do Pará.

Silva et al. (2014) avaliaram 3.917 amostras de soro de fêmeas bubalinas, gestantes e não gestantes, no estado do Pará, por meio do teste do antígeno acidificado tamponado 4,8% dos animais foram positivos para brucelose e pelo teste 2-ME, 95,7% dos resultados foram confirmados. A soroprevalência foi influenciada significativamente pelo estado reprodutivo, com as fêmeas grávidas sendo mais vulneráveis, demonstrando que a infecção é ativa na

região brasileira que contém a maior população de búfalos e que esta doença representa um perigo para a saúde pública e produção de búfalos.

3.4. PATOGENIA

A infecção se inicia principalmente pelas mucosas oral, nasofaríngea, conjuntival ou por solução de continuidade da pele (CAMPAÑA et al., 2003). As búfalas infectadas eliminam a bactéria durante o aborto, servindo como fonte de infecção e estudos experimentais demonstraram que a ingestão de *B. abortus* causa infecção nas búfalas (MOHAN, 1968).

Após a infecção, as bactérias são fagocitadas principalmente por macrófagos, sendo carreadas até os linfonodos regionais, onde, como microrganismos intracelulares facultativos, multiplicam-se dentro dos macrófagos (ACKERMANN; CHEVILLE; DEYEOE, 1988), podendo permanecer por semanas a meses, levando a alterações inflamatórias e anatomopatológicas com hiperplasia e linfadenite (CARVALHO NETA et al., 2009; SOUSA et al., 2015b).

A partir dos linfonodos regionais, os microrganismos podem se disseminar livremente ou no interior de macrófagos, por via hematogena ou linfática, espalhando-se para outros linfonodos, principalmente os mamários, e em órgãos ricos em células mononucleares fagocitárias, podendo sobreviver nestes locais por longos períodos, escapando da resposta imune (HARMON; ADAMS; FREY, 1988; CAMPAÑA et al., 2003; XAVIER et al., 2009; SOUSA et al., 2015b). Sendo que os locais de predileção do gênero *Brucella* são aqueles que oferecem elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol, presente no útero gravídico, tecidos mamários, osteoarticulares e órgãos do sistema reprodutor masculino, possuindo um forte tropismo pelo útero durante o último trimestre de gestação (SAMARTINO; ENRIGHT, 1996; SILVA et al., 2005; XAVIER et al., 2009).

A infecção do útero gestante ocorre por via hematogena, sendo que as alterações variam de acordo com a intensidade da infecção e o tempo de gestação. As brucelas possuem afinidade pelos trofoblastos, devido às altas concentrações de eritritol e progesterona na placenta (SILVA et al., 2005). O processo inflamatório causa lesões necróticas-inflamatórias na placenta além de lise das vilosidades, resultando no descolamento dos cotilédones, prejudicando a circulação materno-fetal, dificultando a passagem de nutrientes e oxigênio para o feto, provocando o nascimento de bezerros fracos ou aborto (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; XAVIER et al., 2009; SOUSA et al., 2015a).

3.5. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da brucelose estão relacionados à idade reprodutiva dos animais, estado imunológico, vias de infecção e virulência da estirpe de *Brucella* (ADAMS, 2002). Nos animais compromete, sobretudo, os sistemas reprodutivo e osteoarticular, causando redução da fertilidade em machos e fêmeas, nascimento de bezerros fracos e ocasionando com frequência o abortamento no terço final da gestação (MATHUR, 1964; MOHAN, 1968; ENRIGHT, 1990; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; POESTER; SAMARTINO; LAGE, 2005; XAVIER et al., 2009).

O aborto ocasionado por *B. abortus* depende da gravidade e distribuição das lesões carunculares, que provavelmente causam privação de nutrientes e de oxigênio fetal (XAVIER et al., 2009).

Após o primeiro aborto, devido ao desenvolvimento da imunidade celular, ocorre a diminuição significativa do número e tamanho das lesões nos placentomas nas gestações subsequentes. Portanto, os abortos são menos frequentes, surgindo outras manifestações clínicas da enfermidade como a retenção de placenta, natimortalidade ou o nascimento de bezerros fracos, além de quadros de metrite ou endometrite crônica e conseqüentemente subfertilidade, infertilidade ou esterilidade (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; LAGE et al., 2008; XAVIER et al., 2009).

A brucelose também pode acarretar diminuição na produção de leite e aumento do número de células somáticas no leite (EMMINGER; SCHALM, 1943; MEADOR; DEYOE, 1989).

3.6. PATOLOGIA

3.6.1. Achados macroscópicos

Em bubalinos as lesões macroscópicas são placentite com exsudato de coloração acastanhada e odor fétido, com áreas de necrose e fibrina, além de congestão e hemorragias multifocais. Placentomas com exsudato purulento, útero com focos de necrose nos placentomas com exsudato fibrinopurulento de odor fétido, edema e hemorragia do corioalantoide intercotiledonário. Carúnculas com exsudato fibrinopurulento multifocal e/ou carúnculas com congestão e áreas hemorrágicas (SOUSA et al., 2015a). A placentite necrótica

fibrinopurulenta também é relatada em bovinos (PAYNE, 1959; PALMER; CHEVILLE; JENSEN, 1996; PÉREZ et al., 1998; XAVIER et al., 2009).

3.6.2. Achados microscópicos

Os achados microscópicos da brucelose em bubalinos são placentite caracterizada pela presença de focos de necrose e denso infiltrado inflamatório por células polimorfonucleares, congestão, hemorragia e áreas com exsudação por fibrina. Além de infiltrado inflamatório por linfócitos, plasmócitos e microgranulomas com alguns neutrófilos, e invasão e multiplicação de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas nas células trofoblásticas da placenta. Endometrite supurativa crônica com áreas de fibrose e presença de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas na superfície endometrial ulcerada (SOUSA et al., 2015a). A placentite neutrofílica necrótica com infiltrados perivasculares também foi relatada em bovinos (PAYNE, 1959; XAVIER et al., 2009).

Nos linfonodos observa-se congestão, edema, fibrina, infiltração por neutrófilos, histiócitos e plasmócitos, o que caracteriza uma linfadenite regional (SOUSA et al., 2015b).

Nos fetos bubalinos observa-se fígado com infiltrados linfocitários em focos pequenos, distribuídos por todo o parênquima, com lesão leve a moderada, vacuolização difusa dos hepatócitos, congestão nos rins e baço, congestão, edema e fibrina nos linfonodos (SOUSA et al., 2015a).

3.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da brucelose pode ser feito por métodos diretos e indiretos. Os métodos indiretos por testes sorológicos, visando a detecção de anticorpos anti-*Brucella* spp., sendo de baixo custo, praticidade e rapidez (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). Os métodos de diagnósticos oficiais, preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do manual do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), da enfermidade em bubalinos vêm sendo realizados da mesma forma que para os bovinos. As provas empregadas no diagnóstico da brucelose são o teste do anel do leite (TAL) e o teste de soroaglutinação com o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), empregados como testes de triagem, e o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) e a Fixação do Complemento (FC), empregados como testes confirmatórios (BRASIL, 2006).

Porém, podem ser empregados outros testes como o teste de Polarização Fluorescente (PF) (NILSEN, et al., 2001; PAULIN et al., 2012), o teste imunoenzimático ELISA competitivo (ELISA-C) (PAULIN et al., 2012) e o ensaio imunoenzimático com proteínas-G (ELISA-G) (KUMAR; CHAND, 2011). Sendo que os testes sorológicos mais promissores para o diagnóstico da brucelose em búfalos foram o ELISA competitivo (MATHIAS et al., 1998; MOLNÁR et al., 2002; PAULIN et al., 2012) e o teste de PF (MONTAGNARO et al., 2008, PAULIN et al., 2012). Ensaio do teste Dot-Blot (DB) e Fixação do Complemento, também se mostraram eficientes para detectar títulos significativos em búfalos vacinados com duas doses de RB51, ambos podem ser usados na vigilância sorológica para detecção precoce de animais infectados (RAMNANAN et al., 2012).

Os métodos diretos de diagnóstico da brucelose podem ser realizados por testes bacteriológicos e detecção de ácidos nucleicos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Um teste que vem se destacando no diagnóstico da brucelose é a PCR em tempo real (qPCR) por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade (HINIĆ et al., 2009; CAITANO et al., 2014). A PCR tem sido uma alternativa promissora ao diagnóstico direto de organismos de crescimento lento e em detectar pequenas quantidades de DNA de microrganismos na amostra, independente de sua viabilidade (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991; AL DAHOUK et al., 2003, SOUSA et al, 2015ab).

3.8. CONTROLE E PROFILAXIA

O controle da brucelose bubalina tem se baseado na vacinação das fêmeas de três a oito meses de idade com a amostra B19 de *B. abortus*, a realização de testes laboratoriais para movimentação de animais para reprodução e eliminação dos reagentes de acordo com o PNCEBT, o programa não faz distinção entre as espécies bovina e bubalina (BRASIL, 2006).

A vacina B19 é a mais utilizada em todo o mundo, sendo empregada no controle da brucelose em vários países que conseguiram reduzir a prevalência ou erradicar a doença (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). A vacina B19 é uma vacina viva atenuada, de baixo custo e capaz de induzir imunidade duradoura, contudo, a persistência dos títulos vacinais depende da idade dos animais na vacinação (SELLEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010). Sendo utilizada desde 1930 em bovinos e bubalinos, como ferramenta eficiente na prevenção da brucelose nos rebanhos (CRASTA et al., 2008). A B19 é uma estirpe lisa de *Brucella*, sendo assim os animais vacinados desenvolvem anticorpos vacinais que não podem ser diferenciados de uma infecção por *B. abortus*, pelos testes sorológicos utilizados

rotineiramente, a duração dos anticorpos depende de fatores como idade dos animais na vacinação, via de administração e dosagem (NICOLETTI, 1990).

Jamal, Afzal e Ahmed (2003) demonstraram que fêmeas bubalinas, vacinadas entre três a oito meses, apresentaram um decréscimo na titulação de anticorpos vacinais 91 dias após a vacinação, através dos testes de aglutinação em tubo (SAT) e 2-ME. Nardi Júnior et al. (2012) avaliaram 21 bezerras bubalinas, com idade entre três a oito meses, vacinadas com a cepa B19 de *B. abortus*, verificaram que com 270, 300 e 360 dias após vacinação, os animais não apresentavam reações positivas aos testes FC, AAT e 2-ME, respectivamente. Caporale et al. (2010) verificaram que bubalinos vacinados com a vacina B19 foram resistentes à infecção experimental pela cepa 544 de *B. abortus*, 33 dias após a vacinação. Pereira et al. (2015) avaliaram 36 fêmeas bubalinas, com idades entre três a oito meses, as quais receberam vacina B19 em dose padrão, somente aos 390 dias após vacinação, 100% das fêmeas obtiveram reação negativa nos testes do AAT e 2-ME, mostrando-se a vacinação com a B19 eficaz para a imunização, sendo uma ferramenta importante na profilaxia da brucelose na espécie estudada, bem como as provas aplicadas para o diagnóstico dessa enfermidade em búfalos a nível regional.

Alguns estudos em bubalinos demonstraram que a vacinação com a estirpe RB51 pode não oferecer proteção aos animais vacinados após a exposição a rebanhos infectados naturalmente (FOSGATE et al., 2003). Em outros estudos não foram possíveis identificar os protocolos que protegem os bubalinos da infecção com cepas de campo de *B. abortus* (DIPTEE et al., 2007). Estudos identificaram *B. abortus* RB51 em amostras de leite, sugerindo que esta vacina pode ser excretada no leite de búfalas adultas quando vacinadas, ao passo que dados demonstraram que a vacina é segura para uso em búfalos jovens, quando não haverá excreção de leite (LONGO et al., 2009). Contudo, a vacina RB51, utilizada em uma dosagem três vezes maior do que o aprovado em bovinos e um reforço após um mês pode ser eficaz contra *B. abortus* em bubalinos (CAPORALE et al., 2010).

Os anticorpos induzidos pela vacinação com RB51 não são detectáveis utilizando as técnicas de diagnóstico convencionais, sendo, portanto, necessário dispor de uma ferramenta de diagnóstico específico capaz de diferir animais vacinados dos não vacinados. A combinação de um teste de fixação do complemento com antígeno específico RB51 (RB51-FC) e um teste cutâneo brucelina RB51, foi avaliado para bubalinos na Itália, utilizando 127 animais, todos negativos ao AAT e FC, os quais foram vacinados com a vacina RB51. Foi observado que 84% dos animais apresentaram reação positiva ao RB51-FC e que 87% positivos ao teste de pele brucelina RB51, 11 dias após a inoculação. Os resultados sugerem

que a utilização em paralelo do teste cutâneo brucelina RB51 com RB51-FC pode representar um sistema de diagnóstico confiável para identificar búfalos vacinados com a vacina RB51 (TITTARELLI et al., 2015).

A falta de programas de controle sanitário específico para bubalinos no Brasil e as condições ambientais, faz com que a brucelose em búfalos seja de difícil controle (GUARINO et al., 2001). Contudo, a vacinação contra a brucelose das fêmeas de três a oito meses e o sacrifício dos animais positivos, continua sendo a melhor forma de controle da enfermidade nos bubalinos. Além disso, as diferenças na epidemiologia da doença entre as espécies bovina e bubalina são importantes no estabelecimento de medidas de controle específico para bubalinos (FOSGATE et al., 2011).

4. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.R.; CHEVILLE, N.F.; DEYEOE, B.L. Bovine ileal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. **Veterinary Pathology**, v. 25, p. 28-35, 1988.
- ADAMS, L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 553-561, 2002.
- ADESIYUN, A.A. et al. Comparative study on responses of cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) to experimental inoculation of *Brucella abortus* biovar 1 by the intraconjunctival route-a preliminary report. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, n. 8, p. 1685-94, 2010.
- ADESIYUN, A.A. et al. Virulence of *Brucella abortus* isolated from cattle and water buffalo. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, p. 13–16, 2011.
- AKHTAR, S.; MIRZA, M.A. Rates of seroconversion in the progeny of *Brucella abortus* seropositive and seronegative cattle and buffalo. **Revue Scientifique et Technique**, v. 14, p. 711–718, 1995.
- AL DAHOUK, S. et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. **Clinical Laboratory**, v. 49, n. 9-10, p. 487-505, 2003.
- FAO/WHO. Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Expert Committee on Brucellosis**. World Health Organization Technical Report Series 740. World Health Organization, Geneva, 1986.
- BASTIANETTO, E. et al. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco - Minas Gerais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 1, p. 55-56, 2005.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. 9p., Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 out. 2012, 2006.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo Population and Strategies in the World. In: **BUFFALO PRODUCTION AND RESEARCH**, Cap. I, Roma: FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/search/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=buffalo&cof=FORID%3A9>>. Acesso em: 01 fev. 2016, 2005.

BORRIELLO, G. et al. Link between geographical origin and occurrence of *Brucella abortus* biovars in cow and water buffalo herds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 1039-1043, 2013.

BUDDLE, M.B. Studies on *Brucella ovis* sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 3, p. 351-364, 1956.

CAITANO, M.A.B. et al. Detecção de *Brucella abortus* em tecidos bovinos utilizando ensaios de PCR e qPCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 497-502, 2014.

CAMPAÑA, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 20p., 2003.

CAPORALE, V. et al. Efficacy of *B. abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *B. abortus* strain 19 in water buffalo. **Veterinaria Italiana**, v. 46, p. 13-19, 2010.

CARMICHAEL, L.E; BRUNER, D.W. Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. **The Cornell Veterinarian**, v. 48, n. 4, p. 579-592, 1968.

CARVALHO NETA, A.V. et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2; p. 146-155, 2009.

CHAVES, N.P. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 131-134, 2012.

CHEVILLE, N.F. et al. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1591-1597, 1993.

COCKRILL, W.R. **The Water Buffalo**. Scientific American, 1967.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 213-221, 1997.

COSTA, E.O.; CURY, R.S.; ROCHA, U.F. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos *Bubalus bubalis* (Lineaeus, 1958) no Estado de Goiás. Inquérito Sorológico. **Biológico**, v. 39, p. 162-164, 1973.

COSTA, N.A. et al. **Sistema integrado de pastagem nativa de terra inundável e cultivada de terra firme na recria e engorda de bubalinos**. Belém: EMBRAPA-CPATU. EMBRAPA-PNP-BUBALINOS. Projeto 803.81.003/5 Form.13/92, 1-14, 1992.

CRASTA, O.R. et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, e2193, 2008.

DIPTEE, M.D. et al. Post-exposure serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) to *Brucella abortus* biovar 1 following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 26, n. 3, p. 669-678, 2007.

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

EMMINGER, A.C.; SCHALM, O.W. The effect of *Brucella abortus* on the bovine udder and its secretion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 4, p. 100-109, 1943.

ENRIGHT, F.M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection on domestic animals. **In: Animal brucellosis**. (Nielsen, K.; Duncan, R., eds), Boca Raton, p. 301-320, 1990.

EVANS, A.C. Comments on the early history of human brucellosis. In: LARSON, C.H.; SOULE, M.H. (Ed.). **Brucellosis**. Baltimore: Waverly Press, p. 1-8, 1950.

FAO. **Animal Health Yearbook**. Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Office of Epizootics/World Health Organization, Roma, 1997.

FOSGATE, G.T. et al. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, p. 211-215, 2003.

FOSGATE, G.T. et al. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, p. 1479-1486, 2011.

FOSGATE, G.T. et al. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, p. 211-215, 2003.

FOSGATE, G.T. et al. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. **Veterinary Record**, v. 151, p. 272-273, 2002.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 2688-2693, 2007.

GAROFOLO, G. et al. Genome sequences of 11 *Brucella abortus* isolates from persistently infected Italian Regions. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. e01402-15, 2015.

GARCIA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the Americas**. Office International des Épidémiologies. Paris, 1990.

GENTILE, A. Brucellosis in buffaloes. **Veterinaria Italiana**, v. 8, p. 591-596, 1957.

GUARINO, A. et al. Indirect ELISA for diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 88-90, 2001.

HINIĆ, V. et al. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 1-8, 2009.

HARMON, B.G.; ADAMS, L.G.; FREY, M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p.1092-1097, 1988.

HUDDLESON, I.F. The differentiation of the species of the genus *Brucella*. **American Journal of Public Health**, v. 100, n. 5, p. 491-498, 1931.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. 2014.
Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/>>. Acesso em: 29 out. 2015.

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.

JORGE, A.M. Produção de carne bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 84-95, 2005.

KONRAD, J.L. et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., and Apicomplexa protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina. **Tropical Animal Health Production**, v. 45, n. 8, p. 1751-1756, 2013.

KUMAR, M.; CHAND, P. Improvement in the diagnosis of *Brucella abortus* infections in naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) using an ELISA with a Protein-G-based indicator system. **Tropical Animal Health Production**, v. 43, n. 8, p. 1493-1499, 2011.

LAGE, A.P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 202-212, 2008.

LÁU, H.D.; SINGH, N.P. Distribuição e prevalência da brucelose em búfalos no estado do Pará. **Boletim de Pesquisa, EMBRPA-CPATU**, v. 76, 1985.

LONGO, M. et al. Shedding of *Brucella abortus* rough mutant strain RB51 in milk of water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 90, n. 1-2, p. 113-118, 2009.

MARTÍNEZ, D. et al. Pheno - and genotyping of *Brucella abortus* biovar 5 isolated from a water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetus: First case reported in the Americas. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 172-176, 2014.

MATHIAS, L.A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 111-114, 1998.

MATHUR, T.N. *Brucella* isolates from cows, buffaloes, goats, sheep and human beings at Karnal: Their significance with regard to the epidemiology of brucellosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 52, p. 10, 1964.

MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. **Veterinary Pathology**, v. 26, p. 513-515, 1989.

MEGID, J. et al. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **Veterinary Record**, v. 156, n. 5, p. 147-148, 2005.

MENSHAWY, A.M.S. et al. Assessment of Genetic Diversity of Zoonotic *Brucella* spp. Recovered from Livestock in Egypt Using Multiple Locus VNTR Analysis. **BioMed Research International**, Article ID 353876, 7p., 2014.

- MOHAN, R.N. Diseases and parasites of buffaloes. **The Veterinary Bulletin**, v. 38, p. 647-659, 1968.
- MOLNÁR, L. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 41-44, 2002.
- MONTAGNARO, S. et al. 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, n. 1-2, p. 135-142, 2008.
- MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. *Brucella* evolution and taxonomy. **Veterinary microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 209-227, 2002.
- MOURA CARVALHO, L.O.D.; LOURENÇO JUNIOR, J.B; TEIXEIRA NETO, J.F. **Programa de soerguimento da bubalinocultura no Estado do Pará**. Belém: Associação Paraense de Criadores de Búfalos, 1997.
- NARDI JÚNIOR, G. et al. 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.
- NASIR, A.A. et al. Seroprevalence of brucellosis in animals at government and private livestock farms in Punjab. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 24, n. 3, p. 144-146, 2004.
- 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.
- NIELSEN, K. et al. 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. et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 25-30, 2004.

OGASSAWARA, S. et al. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 36, p. 117-121, 1969.

OSTERMAN, B.; MORIYON, I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1173-1175, 2006.

PACHECO, G.; MELLO, M. T. **Brucelose**. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 727p., 1956.

PALMER, M.V.; CHEVILLE, N.F.; JENSEN, A.E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 682-691, 1996.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O Combate a Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. Jaboticabal, Funep, 2003.

PAULIN, L.M.S. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 239-249, 2003.

PAULIN, L.M.S. et al. Fluorescence polarization assay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1621-1626, 2012.

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

PEREIRA, A.P.M. Humoral immune response of buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) vaccinated with B19 strain of *Brucella abortus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 56-61, 2015.

PÉREZ, J. et al. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 17-21, 1998.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; LAGE, A.P. Diagnóstico da Brucelose Bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 13-29, 2005.

POLDING, J.B. Brucellosis in India. **Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 17, p. 147–155, 1947.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London, Wolfe, 2005.

RAMNANAN, A. et al. Serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) vaccinated with two doses of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 1451-1458, 2012.

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

RENUKARADHYA, G.J.; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. **Veterinary Microbiology** v. 90, p. 183–195, 2002.

SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.M. *Brucella abortus* differs in the multiplication with in bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 55-63, 1996.

SANDOVAL, L.A. et al. Pesquisas em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo - Brasil. **Biológico**, v. 45, n. 11, p. 209-212, 1979.

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.

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

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 375-382, 2008.

SCHOLZ, H.C. et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 153-156, 2009.

SCHOLZ, H.C. et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 801-808, 2010.

SILVA, F.L. et al. Brucelose bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 1-12, 2005.

SILVA, J.B. et al. Serological survey and risk factors for brucellosis in water buffaloes in the state of Pará, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 385-389, 2014.

SILVA, J.B.; FONSECA, A.H.; BARBOSA, J.D. Serological survey of *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* and *Borrelia burgdorferi* in water buffaloes in the northern region of Brazil. **Revista de Salud Animal**, v. 36, n. 1, p. 35-39, 2014.

SOUSA, M.G.S. et al. Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 882-888, 2015a.

SOUSA, M.G.S. et al. Detecção de *Brucella abortus* em linfonodos de búfalas (*Bubalus bubalis*) em diferentes fases da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 951-955, 2015b.

STOENNER, H.G.; LACKMAN, D.B. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat *Neotoma lepida* Thomas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 69, p. 947-951, 1957.

TITTARELLI M. et al. A diagnostic protocol to identify water buffaloes (*Bubalus bubalis*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. **Veterinaria Italiana**, v. 51, n. 2, p. 99-105, 2015

VASSALLO, D.J. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v. 138, p. 140–150, 1992.

WHATMORE, A.M. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4120-4128, 2014.

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.

XAVIER, M.N. et al. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, 2009.

5. CAPÍTULO II: INFECÇÃO TRANSPLACENTÁRIA E INTRAUTERINA POR *Brucella abortus* EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)¹

Melina G.S. Sousa², Felipe M. Salvarani², Henrique A. Bomjardim², Antonio A. Fonseca Jr³, Ingrid S. Preis³, Marilene F. Brito⁴, Rômulo C. Leite² e José D. Barbosa^{2*}

ABSTRACT.- Sousa M.G.S., Salvarani F.M., Bomjardim H.A., Fonseca Jr A.A., Preis I.S., Brito M.F., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. [**Placenta and intrauterine infection by *Brucella abortus* in buffaloes (*Bubalus bubalis*).**] Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(11):882-888. Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brazil. E-mail: diomedes@ufpa.br

The objective of this study was to detect *Brucella abortus* and injuries caused by the bacteria in fetal membranes and fetuses. Twenty buffaloes serologically positive for brucellosis were used and subjected to stamping for collection of material from the closed uterus of several months gestation. Fetal age was determined by ultrasound examination and the size of fetuses was measured at necropsy. The samples were subjected to histopathology and qPCR. From the second month of pregnancy on it was possible to detect the presence of *B. abortus* DNA in amniotic fluid, allantoic liquid and uterus, and from the fifth month on in placenta, heart, spleen, kidney, lung, intestine, liver and lymph nodes of the fetuses. The main pathological findings were fibrinous suppurative necrotic placentitis, and chronic endometritis.

¹ Recebido em 25 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 18 de novembro de 2015.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará (UFPA), Rodovia BR- 316 km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brasil. *Autor para correspondência: diomedes@ufpa.br

³ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro-MG), Av. Rômulo Joviano s/n, Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, MG 33600-000, Brasil.

⁴ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

INDEX TERMS: Brucellosis, buffaloes, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, transplacental infection.

RESUMO.- O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Brucella abortus* e as lesões causadas por esse agente nos anexos fetais e nos fetos de búfalas. Para isso, 20 búfalas em diversos meses de gestação, sorologicamente positivas para brucelose, foram submetidas ao abate sanitário. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos associados à mensuração dos fetos durante a necropsia. Do útero fechado desses animais foram coletadas amostras para histopatologia e qPCR. A partir do segundo mês de gestação foi possível detectar a presença de DNA de *B. abortus* em líquido amniótico, líquido alantoide e em útero e, a partir do quinto mês, na placenta, coração, baço, rim, pulmão, intestino, fígado e linfonodos dos fetos. Os principais achados anatomopatológicos foram placentite fibrino-purulenta necrótica e endometrite supurativa crônica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, búfalos, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, infecção transplacentária.

INTRODUÇÃO

A bubalinocultura tem importância no mundo inteiro, como fonte de proteína; é utilizada na tração, além de ser capaz de sobreviver em terras pobres e subsistir com baixa qualidade de forragens. No entanto, pesquisas específicas com bubalinos são limitadas, por não se tratar de um animal importante em muitos países que possuem os recursos necessários para realizar grandes projetos e assegurar a publicação dos resultados na literatura internacional (Fosgate et al. 2011).

O Brasil possui 1.277.199 bubalinos; a região Norte, com 820 mil animais, é a maior produtora do País, com destaque para o estado do Pará, que responde por 37,9% do rebanho nacional (IBGE 2011).

A brucelose, doença infectocontagiosa de evolução geralmente crônica e de caráter granulomatoso, infecta as células do sistema mononuclear fagocitário. O principal agente para bubalinos, assim como para bovinos, é uma bactéria intracelular facultativa, a *Brucella abortus* biotipo1 (Cheville et al. 1993, Fosgate et al. 2002, Megid et al. 2005, Xavier et al. 2009), que tem como principal fonte de contaminação a via digestiva (Payne 1959). A brucelose provoca grandes prejuízos econômicos devido a problemas reprodutivos (Corbel 1997) e é uma das zoonoses que também afeta o búfalo doméstico. Apesar de semelhanças com a brucelose bovina, as diferenças na epidemiologia da doença entre essas espécies são importantes no estabelecimento de medidas de controle (Fosgate et al. 2011).

No Brasil, o primeiro relato de brucelose em búfalos foi efetuado por Santa Rosa et al. (1969), que encontraram 40,9% (27/66) dos búfalos reativos ao teste de soroaglutinação rápida em placa. No entanto, o primeiro isolamento em búfalas adultas no Brasil foi estabelecido por Ogassawara et al. (1969) a partir do conteúdo de um hígroma articular, do qual isolou *B. abortus*. Posteriormente, outros trabalhos evidenciaram a presença de brucelose nessa espécie, por meio de testes sorológicos (Bastianetto et al. 2005). No estado do Pará, a prevalência encontrada foi de 3,67% (176/4796) bubalinos positivos ao teste 2-mercaptoetanol (2-ME) (Silva et al. 2014).

Esta enfermidade foi diagnosticada em ruminantes domésticos no Egito, onde se demonstrou a presença de estirpes de *B. suis* e *B. abortus*, identificadas por meio de PCR, em ruminantes domésticos incluindo-se os bubalinos (Menshawy et al. 2014), e em Trinidad e Tobago, por meio de testes sorológicos e bacteriológicos (Fosgate et al. 2002), bem como no Paquistão onde também foi identificada *B. abortus* em explorações pecuárias privadas (Nasir et al. 2004).

Além de provocar aborto a brucelose causa placentite necrosante fibrinosa (Payne 1959, Palmer et al. 1996, Pérez et al. 1998, Xavier et al. 2009), com produção de exsudato amarelo acastanhado e odor fétido, contendo fibrina, restos necróticos e infiltrados perivascularares no útero (Xavier et al. 2009).

O diagnóstico desta enfermidade em bubalinos vem sendo realizado da mesma forma que para os bovinos, através de diferentes testes sorológicos e do isolamento do agente. As provas sorológicas empregadas no diagnóstico são teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Fixação do Complemento (FC) e teste de Polarização Fluorescente (PF) (Nielsen 2001). Porém, podem ser empregados outros testes como o imunoenzimático competitivo (ELISA-C) (Paulin et al. 2012) e ensaio imunoenzimático com proteínas-G (ELISA-G) (Kumar & Chand 2011).

Um teste que vem se destacando no diagnóstico da brucelose é o teste de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade (Hinić et al. 2009, Caitano et al. 2014).

Não foram encontrados dados que demonstrassem a presença de *B. abortus* na espécie bubalina, assim como as lesões causadas por esse agente nos anexos fetais e no feto de bubalinos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *B. abortus* em búfalas sorologicamente positivas para brucelose, assim como caracterizar as lesões histológicas causadas por esse agente, nos anexos fetais e nos fetos de búfalas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram utilizadas 20 búfalas mestiças da raça Murrah, primíparas, provenientes da Ilha de Marajó, estado do Pará, com 24 a 30 meses de idade, sorologicamente positivas para brucelose. As búfalas passaram por um período de adaptação de seis meses em uma propriedade no município de Castanhal, PA, e foram submetidas à inseminação artificial; nas que não emprenharam foram realizados repasse com o touro através de monta natural.

Coleta das amostras. Para confirmação da enfermidade foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular, em tubos de 10mL à vácuo; o soro foi separado por meio de centrifugação a 3000rpm por cinco minutos e foram armazenados a -20°C até a realização do teste sorológico. Os soros foram analisados por meio do teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e os testes confirmatórios de Fixação do Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (PF) conforme recomenda o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (Brasil 2006). Todos os testes foram realizados no Instituto Biológico em São Paulo.

Os animais do presente estudo, sorologicamente positivos para brucelose, foram submetidos ao abate sanitário em matadouros frigoríficos localizados nos municípios de Castanhal e Belém, estado do Pará, sob inspeção estadual e federal, respectivamente, conforme a legislação vigente. Foi realizada a coleta do útero fechado das 20 búfalas. Nas gestações até o quarto mês foram coletados líquido alantoide, líquido amniótico e útero. Nas gestações a partir do quinto mês, foram colhidas amostras de líquido amniótico, líquido alantoide, cotilédone, placenta, e dos fetos, fragmentos de fígado, rim, baço, pulmão, coração, intestino, linfonodo pré-escapular e líquido abomasal. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos, realizados mensalmente, associados à mensuração do feto durante a necropsia, conforme recomendado por Barr et al. (1990).

As amostras foram coletadas em duplicata, com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), tubos e frascos esterilizados para coleta individuais. Uma das amostras foi congelada e enviada ao Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LBM Lanagro/MG) para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A outra amostra foi fixada em formol a 10% e enviada ao Setor de Anatomia Patológica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram submetidas ao processamento de rotina para histopatologia, cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

Extração de DNA. Todas as amostras de tecidos foram homogeneizadas e submetidas à extração de DNA genômico com o kit comercial *QIAamp Cador Pathogen mini kit*

(Qiagen®), utilizando-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador de peso molecular 1Kb, corado com *Blue green* (LGCbio), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

PCR em Tempo Real (qPCR). O ensaio foi realizado utilizando-se os oligonucleotídeos Bru.is711.128.F (TGGTGCTGTCAATGAGGAC), Bru.is711.128.F (GACCTTCGGCAAATGGACAG), Bru. is711.128.S (5'.FAM-CGGCGTATCAGCCAGGGCAT-IowaBlack.3') para amplificação da sequência de inserção 711 do gênero *Brucella*. Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 2,0µL de cada primer à 10µM; 4,4µL de Água Mili-Q ultrapura, 0,6µL de MgCl₂, 1,0µL de sonda e 12,5µL de Mix Quantitect (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo do fornecedor. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata em termociclador *LigthCycler*® 480 II (Roche), com Software Release 1.5.0 SP4.

RESULTADOS

No Quadro 1 mostram-se os anexos fetais (líquido amniótico, líquido alantoide e útero) dos quais foi detectada a presença de *Brucella abortus* do primeiro ao quarto mês de gestação. Verificou-se que a partir do segundo mês foi possível detectar DNA de *B. abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide e útero.

No Quadro 2 observa-se a detecção de DNA de *B. abortus* em búfalas a partir do quinto mês de gestação, nas quais verificou-se a presença da bactéria nos líquidos amniótico e alantoide, placenta e cotilédone. Portanto, *B. abortus* foi detectada em 60% (12/20) dos animais no líquido amniótico, 65% (13/20) no líquido alantoide, 66,66% (8/12) na placenta, 33,33% (4/12) nos cotilédones e 25% (2/8) no útero.

O Quadro 3 mostra os tecidos fetais nos quais foram detectados DNA de *B. abortus* através da qPCR e o período gestacional das búfalas em meses no qual foi realizada a coleta.

Verificou-se que no quinto mês de gestação foi possível detectar DNA de *B. abortus* nos tecidos fetais, sendo que os órgãos nos quais foram detectados com maior frequência foram coração 58,33% (7/12), baço 58,33% (7/12), rim 58,33% (7/12), pulmão 50% (6/12), intestino 50% (6/12), fígado 41,66% (5/12) e linfonodo pré-escapular 33,33% (4/12).

Achados anatomopatológicos

As lesões macroscópicas observadas nos bubalinos foram placentite com exsudato de coloração acastanhada e odor fétido, com áreas de necrose e fibrina, além de congestão e hemorragias multifocais (Búfalas 18 e 20) (Fig.1), e exsudato purulento nos placentomas (Búfalas 18 e 20) (Fig.2-3), útero com focos de necrose nos placentomas, exsudato fibrinopurulento com odor fétido e restos placentários (Búfala 20) (Fig.4), edema e hemorragia do corioalantoide intercotiledonário (Búfala 20) (Fig.5), carúnculas com exsudato fibrinoso multifocal na superfície de corte e outras carúnculas com congestão e áreas hemorrágicas (Búfalas 18 e 20) (Fig.6). Não foram encontradas outras alterações macroscópicas.

Achados histopatológicos

Observou-se placentite caracterizada pela presença de focos de necrose e denso infiltrado inflamatório por células polimorfonucleares, congestão, hemorragia e áreas com exsudação por fibrina. Em outras áreas também foi possível observar infiltrado inflamatório por linfócitos, plasmócitos e microgranulomas com alguns neutrófilos, e invasão e multiplicação de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas nas células trofoblásticas da placenta, muitas das quais necróticas (Búfala 20) (Fig.7- 11), ou ainda endometrite supurativa crônica com áreas de fibrose e presença de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas na superfície endometrial ulcerada (Búfala 20).

Dentre os achados histopatológicos nos fetos bubalinos verificou-se fígado com infiltrados linfocitários em focos pequenos, distribuídos por todo parênquima, com lesão leve (Feto da Búfala 14) a moderada (Fetos das Búfalas 9, 10 e 12) (Fig.12), moderada vacuolização difusa dos hepatócitos (Feto da Búfala 14) e leve congestão no rim e baço (Feto da Búfala 16). Nos linfonodos foram observadas congestão, edema e fibrina moderados (Feto da Búfala 13).

DISCUSSÃO

Considerando-se que os bubalinos, diferentemente dos bovinos, apresentam um período médio de 10,5 meses de gestação (Cockrill 1967), as coletas foram feitas em dois animais em cada mês gestacional. Por meio da utilização da técnica de PCR em tempo real, foi possível detectar a presença de DNA de *Brucella abortus* a partir do segundo mês de

gestação nos líquidos amniótico, alantoide e no útero. Contudo, até o quarto mês de prenhez essa detecção foi feita somente nos líquidos fetais e no útero, pois somente a partir do quinto mês foram coletados tecidos fetais devido ao pequeno tamanho do feto; além disso, não foi possível observar placentomas ou qualquer tipo de conexão entre o endométrio e o córion em fetos bubalinos no terço inicial de gestação, à semelhança dos achados de Morini et al. (2008).

A partir do quinto mês de prenhez foi possível detectar a presença de *B. abortus* nos cotilédones e nos tecidos fetais, como coração, baço, pulmão, rim e fígado. Segundo Ko & Splitter (2003), após a bacteremia, as brucelas alojam-se em tecidos do sistema mononuclear fagocitário, depois invadem o lúmen uterino e as vilosidades coriônicas, pois há maior disponibilidade de elementos para sua multiplicação (produtos da degradação do eritritol, prostaglandina-F2- α e o estradiol-17 β), para finalmente se disseminarem para as vísceras fetais por via hematogênica. Silva et al. (2009), em um estudo realizado em bovinos, utilizaram a PCR para detectar a presença de 12 diferentes agentes infecciosos associados a abortos em bovinos, o que resultou no diagnóstico etiológico em 19% dos casos, os quais avaliaram tecidos incluídos em parafina, e homogeneizados de vários tecidos fetais agrupados juntos e congelados. No estudo verificaram que *B. abortus* foi o agente etiológico detectado com maior frequência. Matrone et al. (2009), ao avaliarem a detecção de *B. abortus* por meio da PCR em amostras de órgãos homogeneizadas de fetos abortados e de bezerros nascidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa de *B. abortus* 2308, concluíram que o pulmão e o baço apresentaram maior probabilidade de sucesso na detecção da bactéria do que o fígado e linfonodo; no nosso estudo o coração, baço, rim, pulmão e intestino foram os órgãos que apresentaram uma maior detecção de *B. abortus*. Cortez et al. (2006) utilizaram macerados de pulmão e cérebro para detecção de DNA de *Brucella* spp. por meio da PCR de 114 fetos bovinos abortados e 10 bezerros com mortalidade perinatal dos quais 13% foram positivos. Nesse estudo de 12 pulmões analisados pela PCR em seis foram detectados DNA de *B. abortus*.

Das Búfalas 13 e 19 não foram detectados DNA de *B. abortus* nas vísceras fetais; a detecção foi feita somente nos líquidos amniótico, alantoide e placenta; provavelmente as concentrações de DNA genômico nas amostras estavam abaixo do limite de detecção.

As lesões macroscópicas observadas no presente estudo em búfalas foram placentite necrótica fibrinopurulenta; essas lesões também descritas por Payne (1959), Palmer et al. (1996), Pérez et al. (1998) e Xavier et al. (2009) em bovinos, além de hemorragias multifocais na placenta também descrita por Xavier et al. (2009) em bovinos. Os estudos na espécie bubalina em relação aos achados anatomopatológicos são escassos, contudo os achados do

presente estudo foram semelhantes aos encontrados em bovinos. Estudos realizados por Fosgate et al. (2002), Fosgate et al. (2003), Diptee et al. (2007), Adesiyun et al. (2010) em bubalinos, com relação às respostas sorológicas a vacinas e infecções experimentais, têm demonstrado que os bubalinos são mais resistentes à infecção por *B. abortus* que os bovinos, e segundo Adesiyun et al. (2011) os búfalos tendem a ser infectados com estirpes de menor virulência. Isso provavelmente também influencia na capacidade de *B. abortus* causar lesões em bubalinos, como observadas nos animais do presente estudo, pois poucos animais apresentaram lesões macroscópicas significativas.

Os achados histopatológicos encontrados nos fetos bubalinos, tais como infiltrados linfoplasmocitários no fígado, com leve congestão em rins e baço, foram semelhantes aos descritos por Hong et al. (1991), em fetos bovinos, os quais descreveram lesões microscópicas que incluem processos inflamatórios vistos no fígado, baço e rim. A placentite fibrinossupurativa observada nos bubalinos do presente estudo caracterizada pela presença de necrose, congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório purulento com fibrina e numerosas colônias bacterianas cocoides, são semelhantes aos achados de Xavier et al. (2009), em bovinos infectados experimentalmente, que observaram placentite necrótica neutrofílica com infiltrado perivascular, associada com um grande número de *B. abortus* intracelularmente em macrófagos e trofoblastos e também extracelularmente em tecidos necróticos. De acordo com Anderson et al. (1986), os trofoblastos são as células alvo principal para a invasão e multiplicação de *B. abortus* na placenta. Samartino & Enright (1996) afirmam que o forte tropismo de *B. abortus* pelo útero se dá principalmente durante o último trimestre de gestação, devido às altas concentrações de eritritol e hormônios esteroides. Contudo, no presente trabalho foi possível verificar que no primeiro trimestre já existe a presença de *B. abortus* no útero dos bubalinos.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que é possível detectar DNA de *Brucella abortus* desde o segundo até o último mês de prenhez em bubalinos, tanto nos líquidos fetais quanto nos tecidos e mostra a transmissão intrauterina como rota de infecção na cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos.

Os achados anatomopatológicos significativos foram placentite fibrinopurulenta a necrótica e endometrite supurativa crônica.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de ajuda de custo referente ao processo 456376/2014-3.

REFERÊNCIAS

- Adesiyun A.A., Fosgate G.T., Persad A., Campbell M., Seebaransingh R. & Stewart-Johnson A. 2010. Comparative study on responses of cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) to experimental inoculation of *Brucella abortus* biovar 1 by the intraconjunctival route: a preliminary report. Trop. Anim. Health Prod. 42(8):1685-94.
- Adesiyun A.A., Fosgate G.T., Seebaransingh R., Brown G., Stoute S. & Stewart- Johnson A. 2011. Virulence of *Brucella abortus* isolated from cattle and water buffalo. Trop. Anim. Health Prod. 43:13-16.
- Anderson T.D., Meador V.P. & Cheville N.F. 1986. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. Vet. Pathol. 23:219-226.
- Barr B.C., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H. & Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet. Pathol. 27:354-361.
- Bastianetto E., Amaral F.R., Carvalho L.B., Oliveira D.A.A. & Leite R.C. 2005. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco, Minas Gerais. Revta Bras. Reprod. Anim. 29(1):55-56.
- Brasil 2006. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): legislação. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, p.36-42.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 54:1591-1597.
- Cockrill W.R. 1967. The Water Buffalo. Scientific American 217:118.
- Corbel M.J. 1997. Brucellosis: an overview. Emerg. Infect. Dis. 3:213-221.
- Cortez A., Castro A.M.G., Heinemann M.B., Soares R.M., Leite R.C., Scarcelli E., Genovez M.E., Alfieri A.A & Richtzenhain. 2006. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58(6):1226-1228.

- Diptee M.D., Asgarali Z., Campbell M., Fosgate G. & Adesiyun A.A. 2007. Post-exposure serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) to *Brucella abortus* biovar 1 following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 26(3):669-678.
- Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Johnson W.O., Hietala S.K., Schurig G.G., Ryan J. & Diptee M.D. 2003. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. Prev. Vet. Med. 58:211-215.
- Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Hietala S.K. & Ryan J. 2002. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. Vet. Rec. 151:272-273.
- Fosgate G.T., Diptee M.D., Ramnanan A. & Adesiyun A.A. 2011. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. Trop. Anim. Health Prod. 43:1479- 1486.
- Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R. & Abri C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. BMC Vet. Res. 5:1-8.
- Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C.J.R., Poonacha K.B., Tuttle P.A. & Cheville N.F. 1991. *Brucella abortus* - associated meningitis in aborted bovine fetuses. Vet. Pathol. 28:492-496.
- IBGE 2011. Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 39. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm> Acesso em 29 out. 2015.
- Ko J. & Splitter G.A. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clin. Microbiol. Rev. 6:65-78.
- Kumar M. & Chand P. 2011. Improvement in the diagnosis of *Brucella abortus* infections in naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) using an ELISA with a Protein-G-based indicator system. Trop. Anim. Health Prod. 43(8):1493-1499.
- Matrone M., Keid L.B., Rocha V.C.M., Vejarano M.P., Ikuta C.Y., Rodriguez C.A.R., Ferreira F., Dias R.A. & Ferreira Neto J.S. 2009. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. Braz. J. Microb. 40:480-489.
- Megid J., Albert D., Fagliari J.J., Paes A.C., Listoni F.P., Pinto A.C., Ribeiro M.G., Thiébaud M., Ueno T. & Garin-Bastiji B. 2005. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. Vet. Rec. 156(5):147- 148.

- Menshawy A.M.S., Perez-Sancho M., Garcia-Seco T., Hosein H.I., García N., Martínez I., Sayour A.E., Goyache J., Azzam R.A.A., Dominguez L. & Alvarez J. 2014. Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *BioMed. Res. Int.* 2014:1-7.
- Morini A.C., Barbosa P.L.G., Melnic R.V., Morini-Junior J.C., Franciulli A.L.R., Martins D.S., Pereira F.T.V., Favaron P.O., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2008. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesq. Vet. Bras.* 28(9):437-445.
- Nasir A.A., Parveen Z., Shah M.A. & Rashid M. 2004. Seroprevalence of brucellosis in animals at government and private livestock farms in Punjab. *Pak. Vet. J.* 24(3):144-146.
- 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. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.* 21(80):163-170.
- Ogassawara S., Cury R., D'apice V.B., Mendes M.F.M. & Rocha U.F. 1969. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 36:117-121.
- Palmer M.V., Cheville N.F. & Jensen A.E. 1996. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 33: 682-691.
- Paulin L.M.S., Samartino L.E., Conde S.B., Federsoni I.S.P., Ferreira F., Amaku M. & Ferreira Neto J.S. 2012. Fluorescence polarization assay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Ciência Rural* 42(9):1621-1626.
- Payne J.M. 1959. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.* 78:447-463.
- Pérez J., Quezada M., Lopez J., Casquet O., Sierra M.A. & Martín de las Mulas J. 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:17-21.
- Ramnanan A., Diptee M., Asgarali Z., Campbell M. & Adesiyun A.A. 2012. Serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) vaccinated with two doses of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1451-1458.

- Samartino L.E. & Enright F.M. 1996. *Brucella abortus* differs in the multiplication with in bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19:55-63.
- Santa Rosa C.A., Castro A.F.P. & Troise C. 1969. Títulos aglutinantes para “*Brucella*” em búfalos do Estado de São Paulo. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 28:35-39.
- Silva T.M.A., Oliveira R.G., Mol J.P.S., Xavier M.N., Paixão T.A., Cortez A., Heinemann M.B., Richtzenhain L.J., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural.* 39(9):2563-2570.
- Silva J.B., Fonseca A.H. & Barbosa J.D. 2014. Serological survey of *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* and *Borrelia burgdorferi* in water buffaloes in the northern region of Brazil. *Revta Salud Anim.* 36(1): 35-39.
- Xavier M.N., Paixão T.A., Poester F.P., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.* 140(2/3):149-157.

Legenda das Figuras

Fig.1. Placentite com exsudato de coloração amarelo acastanhado com fibrina e áreas de necrose (Búfala 18).

Fig.2. Congestão, hemorragia e exsudato purulento nos placentomas (Búfala 18).

Fig.3. Congestão, hemorragia e exsudato purulento no placentoma (Búfala 18).

Fig.4. Útero com necrose nos placentomas, exsudato fibrinopurulento e restos placentários (Búfala 20).

Fig.5. Edema e hemorragia do corioalantoide intercotiledonário (Búfala 20).

Fig.6. Exsudato fibrinoso multifocal na superfície de corte da carúncula, acima, e áreas de hemorragia na carúncula, abaixo (Búfala 18).

Fig.7. Colônias bacterianas basofílicas, congestão e hemorragia em placentoma (Búfala 20). HE, obj.16x.

Fig.8. Placenta com colônias bacterianas basofílicas nas células trofoblásticas, muitas das quais necróticas (Búfala 20). HE, obj.40x.

Fig.9. Necrose e infiltrado inflamatório fibrinopurulento com colônias bacterianas basofílicas em placentoma (Búfala 20). HE, obj.25x.

Fig.10. Placentoma com numerosas colônias bacterianas basofílicas (Búfala 20). HE, obj.16x.

Fig.11. Infiltrado inflamatório por linfócitos, plasmócitos, microgranuloma e alguns neutrófilos em placentoma (Búfala 20). HE, obj.25x.

Fig.12. Fígado com infiltrado linfoplasmocitário multifocal (Feto da Búfala 10). HE, obj.25x.

Quadro 1. Detecção de DNA de *Brucella abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide e útero de fêmeas bubalinas brucélicas do 1º ao 4º mês de gestação

Identificação	Período gestacional	Anexos fetais		
		Líquido amniótico	Líquido alantoide	Útero
Búfala 1	1 mês	-	-	-
Búfala 2	1 mês	-	-	-
Búfala 3	2 meses	+	-	-

Búfala 4	2 meses	+	+	+
Búfala 5	3 meses	-	+	-
Búfala 6	3 meses	+	+	-
Búfala 7	4 meses	+	+	+
Búfala 8	4 meses	+	+	-

+ positivo, -negativo

Quadro 2. Detecção de DNA de *Brucella abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide, placenta e cotilédone de fêmeas bubalinas brucélicas do 5º ao 10º mês de gestação

Identificação	Período gestacional	Anexos fetais			
		Líquido amniótico	Líquido alantoide	Placenta	Cotilédone
Búfala 9	5 meses	-	-	+	+
Búfala 10	5 meses	+	+	-	-
Búfala 11	6 meses	+	+	-	-
Búfala 12	6 meses	-	-	+	+
Búfala 13	7 meses	+	-	+	-
Búfala 14	7 meses	-	+	+	-
Búfala 15	8 meses	-	-	+	-
Búfala 16	8 meses	+	+	+	-
Búfala 17	9 meses	-	+	-	+
Búfala 18	9 meses	+	+	+	-
Búfala 19	10 meses	+	+	-	-
Búfala 20	10 meses	+	+	+	+

+ positivo, -negativo

Quadro 3. Detecção de DNA de *Brucella abortus* através da qPCR nos tecidos fetais e período gestacional das búfalas em meses

Identificação	Período gestacional	Tecidos Fetais							
		Coração	Baço	Rim	Pulmão	Intestino	Fígado	Líquido abomasal	Linfonodo pré-escapular
Búfala 9	5 meses	+	+	-	-	-	-	-	-
Búfala 10	5 meses	+	-	+	+	+	-	-	-
Búfala 11	6 meses	+	+	+	+	+	+	-	-
Búfala 12	6 meses	+	-	-	+	-	-	-	+
Búfala 13	7 meses	-	-	-	-	-	-	-	-
Búfala 14	7 meses	-	+	-	-	-	+	-	-
Búfala 15	8 meses	-	-	+	-	+	-	-	+
Búfala 16	8 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
Búfala 17	9 meses	-	+	+	-	-	+	-	-
Búfala 18	9 meses	+	+	+	+	+	+	+	+
Búfala 19	10 meses	-	-	-	-	-	-	-	-
Búfala 20	10 meses	+	+	+	+	+	-	-	-

+ positivo, -negativo

Fig.1

Fig.2



Fig.3

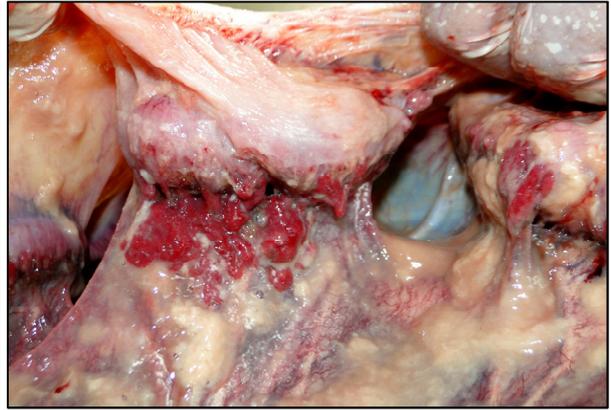


Fig.4



Fig.5



Fig.6



Fig.7



Fig.8

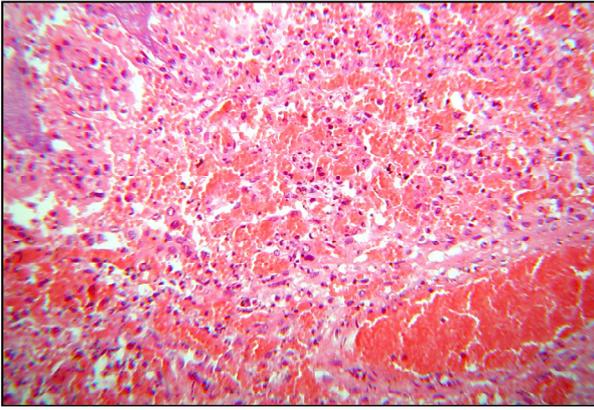


Fig.9

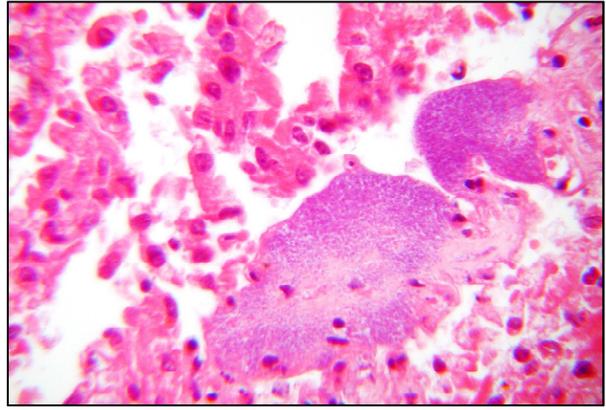


Fig.10

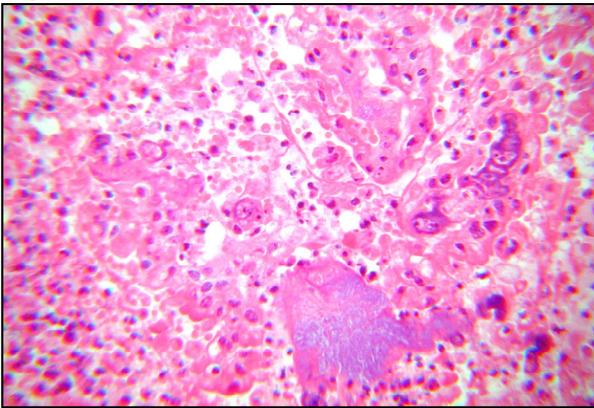


Fig.11

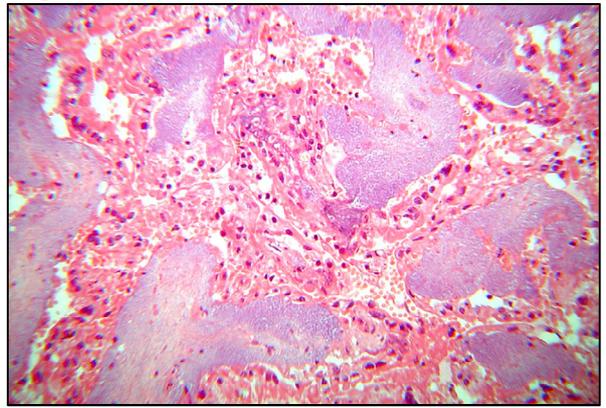
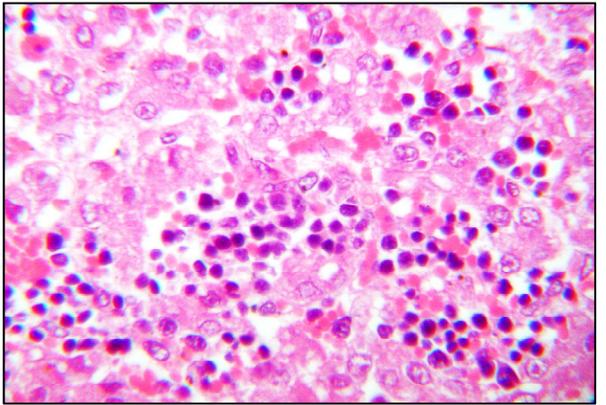
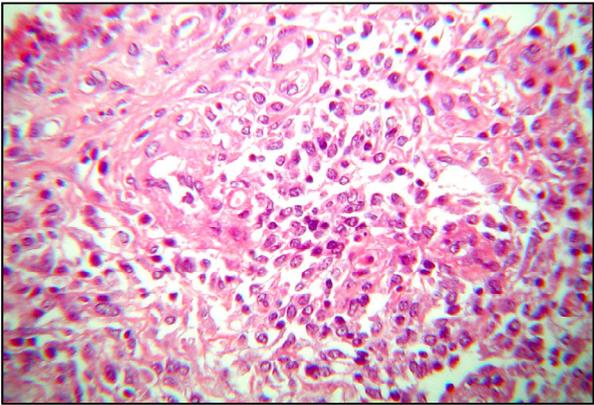


Fig.12



6. CAPÍTULO III: DETECÇÃO DE *Brucella abortus* EM LINFONODOS DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) EM DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO¹

Melina G.S. Sousa², Marilene F. Brito³, Daniel G. Ubiali³, Antonio A. Fonseca Jr⁴, Jenevaldo B. Silva⁵, Alessandra S. Belo Reis², Carlos M.C. Oliveira² e José D. Barbosa^{2*}

ABSTRACT.- Sousa M.G.S., Brito M.F., Ubiali D.G., Fonseca Jr A.A., Silva J.B., Belo Reis A.S., Oliveira C.M.C. & Barbosa J.D. 2015. [Detection of *Brucella abortus* in lymph nodes of buffalo cows (*Bubalus bubalis*) at different stages of pregnancy.] Detecção de *Brucella abortus* em linfonodos de búfalos (*Bubalus bubalis*) em diferentes fases da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(12):951-955. Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brazil. E-mail: diomedes@ufpa.br

The objective of this study was to detect *Brucella abortus* in lymph nodes of buffaloes as well as to describe the lesions caused. Nineteen buffalo cows in various stages of pregnancy, serologically positive for brucellosis and subjected to culling were used. Fetal age was determined by ultrasound examination and the size of fetuses was measured at necropsy. Fragments of lymph nodes were collected for histopathology and qPCR. The detection of *B. abortus* DNA in the lymph nodes was checked from the fourth month of pregnancy in seven buffaloes and in a post-calving buffalo. Acute to chronic lymphadenitis was histologically diagnosed. *B. abortus* DNA was detected in all evaluated groups of lymph nodes; the mammary lymph nodes were the most affected.

INDEX TERMS: Brucellosis, buffaloes, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, lymph nodes.

¹ Recebido em 25 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 16 de dezembro de 2015.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará (UFPA), Rodovia BR- 316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brasil. *Autor para correspondência: diomedes@ufpa.br

³ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: marilene@ufrj.br, danielubiali@hotmail.com

⁴ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro-MG), Av. Rômulo Joviano s/n, Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, MG 33600-000, Brasil.

⁵ Colégio Técnico, UFRRJ, Campus Seropédica, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jenevaldo@hotmail.com

RESUMO.- O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença do DNA de *Brucella abortus* e caracterizar as lesões causadas por esse agente em linfonodos de búfalas. Foram utilizadas 19 búfalas em diversos estágios de gestação, sorologicamente positivas para brucelose, submetidas ao abate sanitário, das quais se coletou fragmentos de diversos linfonodos. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos associados à mensuração dos fetos durante a necropsia. Amostras foram coletadas e submetidas à qPCR e histopatologia. A detecção de DNA de *B. abortus* nos linfonodos das búfalas avaliadas foi verificada a partir do quarto mês de gestação em sete búfalas e em uma búfala pós-parição. Os achados histológicos foram linfadenite aguda a crônica. A presença de DNA de *B. abortus* foi detectada em todos os grupos de linfonodos avaliados, sendo que os linfonodos mais acometidos foram os mamários.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, búfalos, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, linfonodos.

INTRODUÇÃO

Entre outras enfermidades diagnosticadas no estado do Pará, a brucelose em bubalinos se destaca, pois acomete muitos rebanhos, tanto da Ilha de Marajó como do continente (Silva et al. 2014). A enfermidade é caracterizada por ser uma zoonose bacteriana, causada por *Brucella abortus*, com importância econômica devido a problemas reprodutivos (Corbel 1997), sendo o principal agente para bubalinos *B. abortus* biotipo1 (Fosgate et al. 2002, Megid et al. 2005). As vias de infecção por *B. abortus* podem ser alimentar, genital ou respiratória e as fontes principais são fetos abortados, restos placentários, exsudatos uterinos ou sêmen contaminado (Payne 1959, Schlafer & Miller 2007). Após a infecção, as bactérias migram para os linfonodos regionais, e como são microorganismos intracelulares facultativos, proliferam dentro dos macrófagos (Ackermann et al. 1988).

Fosgate et al. (2002) isolaram *B. abortus* por meio de cultura, a partir de um linfonodo mamário, somente em uma, dentre 17 búfalas sorologicamente positivas, naturalmente infectadas (Fosgate et al. 2002). Um estudo de infecção experimental por *B. abortus* em bubalinos jovens, com 3 e 6 meses de idade, revelou soroconversão de 29% dos bubalinos quando desafiados com a cepa S1969D, na dose de $1,7 \times 10^{10}$ UFC, e isolou-se *B. abortus* por meio da bacteriologia somente em homogeneizado de linfonodos parotídeos e pré-escapulares; contudo as contagens de *B. abortus* por grama nos linfonodos foram baixas e variaram entre $1,0 \times 10^2$ a $6,0 \times 10^2$ UFC (Adesiyun et al. 2010). Os achados

anatomopatológicos em linfonodos de bubalinos infectados experimentalmente por *B. abortus* são focos inflamatórios com fibroplasia (Adesiyun et al. 2010).

O diagnóstico utilizado para brucelose em bubalinos tem sido baseado nas pesquisas de anticorpos por métodos sorológicos (Mathias et al. 1998, Fosgate et al. 2002, Molnár et al. 2002, Nasir et al. 2004, Bastianetto et al. 2005, Chaves et al. 2012, Silva et al. 2014, Pereira et al. 2015). Para demonstrar a presença desta bactéria a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) detecta o DNA de *Brucella* spp. em fluidos e tecidos (Sola et al. 2014). Essa ferramenta, de grande valia, vem se destacando no diagnóstico da brucelose por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade (Hinić et al. 2009, Caitano et al. 2014).

Poucos trabalhos demonstraram a presença de *B. abortus* nos linfonodos na espécie bubalina. O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *B. abortus*, nos linfonodos de búfalas em diversos estágios de gestação, assim como caracterizar as lesões anatomopatológicas causadas por esse agente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Das 20 búfalas utilizadas no estudo de Sousa et al. (2015), 19 foram selecionadas para este trabalho, as quais eram mestiças, em diferentes estágios de gestação, primíparas, com idades de 24 a 30 meses, sorologicamente positivas para brucelose e provenientes da Ilha de Marajó, estado do Pará.

Coleta das amostras. Para confirmação da enfermidade foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular, em tubos de 10mL, à vácuo. O soro foi separado por meio de centrifugação a 3000rpm, por cinco minutos e foram armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Os soros foram analisados por meio do teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), e os testes confirmatórios por meio de Fixação do Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (PF), conforme recomenda o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (Brasil 2009); todos os testes foram realizados no Instituto Biológico em São Paulo.

Os animais do presente estudo foram submetidos ao abate sanitário em matadouros frigoríficos localizados nos municípios de Castanhal e Belém, estado do Pará, sob inspeção estadual e federal, respectivamente, conforme a legislação vigente. O período gestacional foi determinado através de exame ultrassonográfico, realizados mensalmente, associados à mensuração do feto durante o abate, conforme recomendado por Barr et al. (1990).

Para a PCR foi realizada a coleta dos linfonodos parotídeo, pré-escapular, mediastínico, pré-crural e mamário das búfalas em diversos estágios de gestação. As amostras foram coletadas com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), tubos e frascos esterilizados para coleta individual. As amostras foram congeladas e enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LBM - Lanagro/MG) para realização da reação em cadeia da polimerase (qPCR).

Para os exames histopatológicos foram avaliados os linfonodos parotídeo, retrofaríngeo, submandibular, pré-escapular, pré-crural, mesentérico, ilíaco interno, íleofemural, mamário e uterino. Essas amostras foram fixadas em formol a 10% e enviadas ao Setor de Anatomia Patológica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), as quais foram submetidas ao processamento de rotina para histopatologia, cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

Extração de DNA. Todas as amostras de tecidos foram submetidas à extração de DNA genômico com o *kit* comercial *QIAamp Cadorn Pathogen mini kit* (Qiagen®), utilizando-se o protocolo recomendado conforme o fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador de peso molecular 1Kb, corado com *blue green* (LGCbio), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

PCR em Tempo Real (qPCR). O ensaio foi realizado utilizando-se os oligonucleotídeos Bru.is711.128.F (TGGTGCTGTCAATGAGGAC), Bru.is711.128.F (GACCTTCGGCAAATGGACAG), Bru. is711.128.S (5´.FAM-CGGCGTATCAGCCAGGGCAT-IowaBlack.3´) para amplificação da sequência de inserção 711 do gênero *Brucella*. Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 2,0µL de cada primer à 10µM; 4,4µL de água Mili-Q ultrapura, 0,6µL de MgCl₂, 1,0µL de sonda e 12,5µL de Mix Quantitect (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo do fornecedor. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata em termociclador *LigthCycler*® 480 II (Roche), com Software Release 1.5.0 SP4.

RESULTADOS

Foram analisadas 95 amostras de linfonodos, das quais em 11,57% (11/95) foram detectados DNA de *B. abortus*.

A presença de DNA de *B. abortus* foi detectada em 10,52% (2/19) dos linfonodos parotídeos, em 5,26% (1/19) dos linfonodos pré-escapulares, em 5,26% (1/19) dos linfonodos mediastínicos, em 10,52% (2/19) dos linfonodos pré-crurais e em 26,31% (5/19) dos linfonodos mamários (Quadro 1). A detecção de DNA de *B. abortus* nos linfonodos das búfalas avaliadas foi verificada a partir do quarto mês de gestação em sete búfalas e em uma búfala pós-parição.

Achados anatomopatológicos

Não foram observadas alterações macroscópicas. Os principais achados histológicos foram: linfonodos parotídeos: acentuada congestão, moderado edema subcapsular, leucocitoestase de neutrófilos, leve infiltração por neutrófilos e eosinófilos, pequenos focos com filamentos de fibrina e áreas de fibrose nos seios subcapsulares e paracorticais. Linfonodos retrofaríngeos: discreto infiltrado por neutrófilos e eosinófilos em meio a ninhos de células histiocitárias. Linfonodos submandibulares: acentuadas congestão e hemorragia, leve edema e pequenos focos com filamentos de fibrina e leve hiperplasia dos folículos linfoides. Linfonodos pré-escapulares: moderada congestão, leve a moderado edema, pequenos focos de infiltração por neutrófilos, raras figuras de cariorrexia, pequenos focos com filamentos de fibrina, rarefação linfoide (Fig.1 e 2), proliferação histiocitária moderada nos seios paracorticais, pequenos focos de infiltração por neutrófilos e leve a moderada hiperplasia linfoide com frequentes mitoses. Linfonodos pré-crurais: leve edema difuso, algumas figuras de cariorrexia, rarefação linfoide ou leve hiperplasia linfoide, frequentes mitoses em folículos linfoides, proliferação de células histiocitárias (Fig.3 e 4) no centro de folículos e na região medular e leve a moderada infiltração por neutrófilos nos seios paracorticais. Linfonodos mamários: leve hiperplasia linfoide, infiltração por neutrófilos e eosinófilos nos seios paracorticais e medulares, moderada proliferação de células histiocitárias em folículos linfoides e nos seios medulares. Linfonodos ilíacos internos: proliferação de células histiocitárias nos seios subcapsulares e paracorticais, frequentes plasmócitos, raros neutrófilos subcapsulares, com edema e fibrina em organização e leve hiperplasia linfoide. Linfonodos íleofemorais: leve edema na região medular, focos com infiltração por neutrófilos, leve hiperplasia folicular e proliferação histiocitária paracortical. Linfonodos mesentéricos: rarefação de folículos linfoides, leve proliferação de células histiocitárias e leve edema nos seios medulares. Linfonodos uterinos: leve hiperplasia linfoide, moderada infiltração por neutrófilos e eosinófilos nos seios paracorticais e medulares e frequentes plasmócitos.

DISCUSSÃO

As alterações encontradas nos linfonodos das búfalas deste estudo são compatíveis com brucelose em ruminantes e complementam os dados encontrados no estudo prévio realizado por Sousa et al. (2015). Verificou-se DNA de *Brucella abortus* nos linfonodos mamários, mediastínicos, parotídeos, pré-crurais e pré-escapulares. Paulin & Ferreira Neto (2003) descreveram que *B. abortus* é frequentemente isolada de linfonodos mamários, seguidos dos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos.

A detecção de DNA de *B. abortus* nos linfonodos das búfalas avaliadas, verificada a partir do quarto mês de gestação no linfonodo pré-escapular, e no sétimo mês no linfonodo mediastínico, sugere a possibilidade de infecção inicial por via respiratória, concordando com Lira (2008), para posterior instalação no útero e regiões que drenam o local. A presença de *B. abortus* nos linfonodos parotídeos a partir do sexto mês de gestação também sugere a via oral como outra fonte de infecção, o que também foi relatado por Lira (2008).

A detecção de DNA de *B. abortus* ocorreu principalmente nos linfonodos mamários, e em menor intensidade nos linfonodos pré-crurais; isso provavelmente se deve ao fato de que esses linfonodos drenam a região da glândula mamária e útero, pois segundo Ko & Splitter (2003), esses são locais de predileção das bactérias em animais no período gestacional devido à grande concentração de produtos da degradação do eritritol. Além disso, tem sido sugerido que os linfonodos que drenam as áreas de infecção ou de lesões têm maior chance de serem positivos para *B. abortus* (Forbes et al. 1989, Palmer et al. 1996). Xavier et al. (2009), verificaram que em vacas prenhes, experimentalmente infectadas por *B. abortus*, os principais locais onde isolaram a bactéria foram os linfonodos mamários e a glândula mamária. Os achados do presente trabalho são semelhantes aos encontrados por Adesiyun et al. (2010), que isolaram *B. abortus* a partir de homogeneizados de linfonodos parotídeos e pré-escapulares de búfalos com 3 a 6 meses de idade, locais próximos ao local de inoculação da bactéria, que foi por via intraconjuntival. Lira (2008) relata a maior frequência da presença de DNA de *B. ovis* nos linfonodos inguinais e parotídeos de ovinos inoculados experimentalmente, explicado pela proximidade com a via de inoculação da bactéria que foi por via intraprepucial e conjuntival respectivamente.

Os principais achados histológicos nos linfonodos do presente estudo foram em alguns linfonodos ora hiperplasia, ora rarefação linfoide, congestão, edema, filamentos de fibrina, bem como infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos, infiltrados de células histiocitárias e áreas de fibrose. Segundo Schlafer & Miller (2007) a infecção por *B. abortus* pode ser debelada nos linfonodos regionais, mas após estabelecida a inflamação espera-se que

haja disseminação do agente durante a fase inflamatória aguda. Pode ocorrer disseminação sistêmica do agente ou a infecção pode se tornar crônica. Nos linfonodos desse estudo foram observadas linfadenite tanto aguda quanto crônica. Esses achados foram semelhantes aos encontrados por Adesiyun et al. (2010), que verificaram focos inflamatórios com fibroplasia; os autores compararam a infecção experimental por *B. abortus* em bovinos e bubalinos, e observaram que as lesões histológicas foram verificadas em maior intensidade nos bubalinos. Já os achados de Xavier et al. (2009) foram linfonodos ilíacos internos e mamários com graus variados de hiperplasia linfoide associada com infiltrados neutrofílicos e infiltrados histiocíticos na medula e paracórtex, em bovinos infectados experimentalmente por *B. abortus*. Nos linfonodos supramamários de bovinos com brucelose Godfroid et al. (2004) relatam hiperplasia linfoide, plasmocitose medular e histiocitose dos seios. Em ovinos, Lira (2008) relatou, em inoculação experimental com a cepa REO 198 de *B. ovis*, linfonodos parotídeos, pré-escapulares, faríngeos, mediastínicos, mesentéricos e inguinais com rarefação linfoide e edema na medular.

Embora tenha sido detectado DNA de *B. abortus* nos linfonodos de búfalas em vários meses de gestação, não foram observadas alterações macroscópicas nos linfonodos. Porém microscopicamente foram verificadas congestão, edema, fibrina, infiltração por neutrófilos, histiócitos e plasmócitos, o que caracteriza uma linfadenite regional; segundo Schlafer & Miller (2007) esses achados demonstram a passagem das brucelas pelos linfonodos regionais nas áreas da infecção.

A não detecção de DNA de *B. abortus* nos linfonodos em alguns dos animais do presente estudo pode ser explicada pelo fato de que após a bacteremia, as brucelas são fagocitadas pelos macrófagos e se multiplicam nos linfonodos regionais, depois invadem o lúmen uterino e as vilosidades coriônicas, onde há maior disponibilidade de substratos para sua multiplicação, como relatado por Ko & Splitter (2003). Portanto, a não identificação do agente sustenta a relação de migração e passagens transitórias do agente pelos tecidos. Essa hipótese também foi levantada por Lira (2008) em ovinos e por Sola et al. (2014) em bovinos.

CONCLUSÃO

A presença de DNA de *Brucella abortus* foi detectada em todos os grupos de linfonodos avaliados a partir do quarto mês de gestação das búfalas, sendo que os linfonodos mais acometidos foram os mamários. Diagnosticou-se linfadenite aguda a crônica ao exame histológico.

REFERÊNCIAS

- Ackermann M.R., Cheville N.F. & Deyoe B.L. 1988. Bovine ileal dome lymphoepithelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.* 25:28-35.
- Adesiyun A.A., Fosgate G.T., Persad A., Campbell M., Seebaransingh R. & Stewart-Johnson A. 2010. Comparative study on responses of cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) to experimental inoculation of *Brucella abortus* biovar 1 by the intraconjunctival route: a preliminary report. *Trop. Anim. Health Prod.* 42(8):1685-1694.
- Bastianetto E., Amaral F.R., Carvalho L.B., Oliveira D.A.A. & Leite R.C. 2005. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco, Minas Gerais. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 29(1):55-56.
- Chaves N.P., Bezerra D.C., Santos L.S., Sá J.S., Santos H.P. & Pereira H.M. 2012. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. *Pesq. Vet. Bras.* 32(2):131-134.
- Corbel M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3:213-221.
- Forbes L.B. & Steele T.B. 1989. An outbreak of *Brucella abortus* biovar 2 in Canadian cattle. *Can. Vet. J.* 30:888-893.
- Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Hietala S.K. & Ryan J. 2002. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. *Vet. Rec.* 151:272-273.
- Fosgate G.T., Diptee M.D., Ramnanan A. & Adesiyun A.A. 2011. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:1479- 1486.
- Godfroid J., Bosman P.P., Herr S. & Bishp G.C. 2004. Bovine brucellosis, p.1510-1527. In: Coetzer Jaw & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock*. Vol.3. 2nd ed. Oxford University Press, Cape Town. 2159p.
- Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R. & Abri C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet. Res.* 5:1-8.
- IBGE 2011. Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 39. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm> Acesso em 29 out. 2015.
- Ko J. & Splitter G.A. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:65-78.

- Lira N.S.C. 2008. Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepucial e conjuntival simultaneamente. Tese de Doutorado, Unesp-Botucatu, SP.
- Mathias L.A., Chaves L.F., Girio R.J.S. & Del Fava C. 1998. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). Pesq. Vet. Bras. 18(3/4):111-114.
- Megid J., Albert D., Fagliari J.J., Paes A.C., Listoni F.P., Pinto A.C., Ribeiro M.G., Thiébaud M., Ueno T. & Garin-Bastiji B. 2005. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. Vet. Rec. 156(5):147-148.
- Molnár L., Molnár E., Lima E.S.C. & Dias H.L.T. 2002. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. Pesq. Vet. Bras. 22(2):41-44.
- Nasir A.A., Parveen Z., Shah M.A. & Rashid M. 2004. Seroprevalence of brucellosis in animals at government and private livestock farms in Punjab. Pak. Vet. J. 24(3):144-146.
- Palmer M.V., Olsen S.C., Gilsdorf M.J., Philo L.M., Clarke P.R. & Cheville N.F. 1996. Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. Am. J. Vet. Res. 57:1604-1607.
- Paulin L.M. & Ferreira Neto J.S. 2003. O combate à brucelose bovina: situação brasileira. Funep, Jaboticabal. 154p.
- Payne J.M. 1959. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. J. Pathol. Bacteriol. 78:447-463.
- Pereira A.P.M., Casseb A.R., Casseb L.M.N., Vale W.G. & Pereira W.L.A. 2015. Humoral immune response of buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) vaccinated with B19 strain of *Brucella abortus*. Archs Vet. Sci. 20(1):56-61.
- Schlafer D.H. & Miller R.B. 2007. Female genital system, p.429-564. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.3. 5th ed. Saunders Elsevier, Toronto. 737p.
- Silva J.B., Fonseca A.H. & Barbosa J.D. 2014. Serological survey of *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* and *Borrelia burgdorferi* in water buffaloes in the northern region of Brazil. Revta Salud Anim. 36(1):35-39.
- Sola M.C., Veiga Jardim E.A.G., Freitas M.R. & Mesquita A.J. 2014. Real-time PCR detection of *Brucella* spp. DNA in lesions and viscera of bovine carcasses. J. Microbiol. Methods 104:87-91.

- Sousa M.G.S., Salvarani F.M., Bomjardim H.A., Fonseca Jr A.A., Preis I.S., Brito M.F., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesq. Vet. Bras.* 35(11):882-888.
- Xavier M.N., Paixão T.A., Poester F.P., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.* 140(2/3):149-157.

Legenda de Figuras

Fig.1. Linfonodo de búfala com brucelose. Rarefação linfoide, marcada congestão e edema. HE, obj.4x.

Fig.2. Linfonodo de búfala com brucelose. Edema e fibrina no seio medular. HE, obj.25x.

Fig.3. Linfonodo de búfala com brucelose. Proliferação histiocitária no seio paracortical. HE, obj.40x.

Fig.4. Linfonodo de búfala com brucelose. Edema e proliferação histiocitária no seio medular. HE, obj.16x.

Quadro 1. Detecção de DNA de *Brucella abortus* nos linfonodos e meses gestacionais correspondentes das búfalas (*Bubalus bubalis*) sorologicamente positivas

Identificação	Idade gestacional (Meses)	Parotídeo	Pré-escapular	Mediastínico	Pré-crural	Mamário
Búfala 1	2°	-	-	-	-	-
Búfala 2	2°	-	-	-	-	-
Búfala 3	2°	-	-	-	-	-
Búfala 4	2°	-	-	-	-	-
Búfala 5	3°	-	-	-	-	-
Búfala 6	3°	-	-	-	-	-
Búfala 7	3°	-	-	-	-	-
Búfala 8	4°	-	-	-	-	-
Búfala 9	4°	-	+	-	-	-
Búfala 10	5°	-	-	-	-	-
Búfala 11	5°	-	-	-	-	-
Búfala 12	6°	+	-	-	+	+
Búfala 13	6°	-	-	-	-	+
Búfala 14	7°	-	-	+	-	-
Búfala 15	8°	+	-	-	-	+
Búfala 16	9°	-	-	-	-	+
Búfala 17	10°	-	-	-	+	-
Búfala 18	10°	-	-	-	-	-
Búfala 19	Pós-parto	-	-	-	-	+

+ Positivo, - negativo

Fig.1

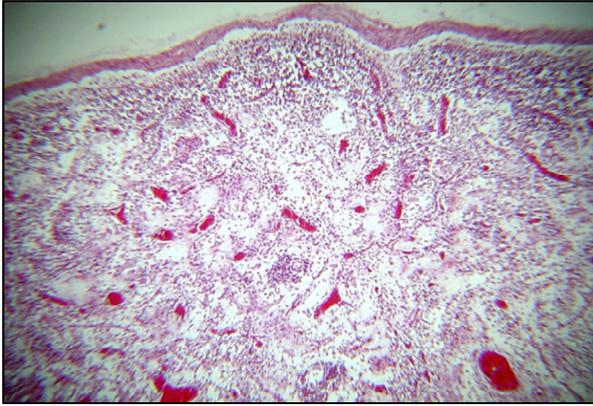


Fig.2

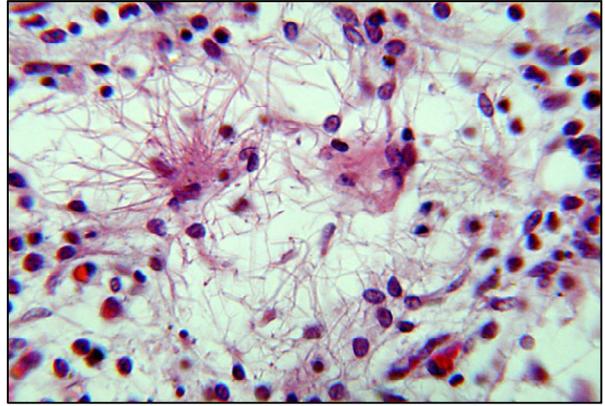


Fig.3

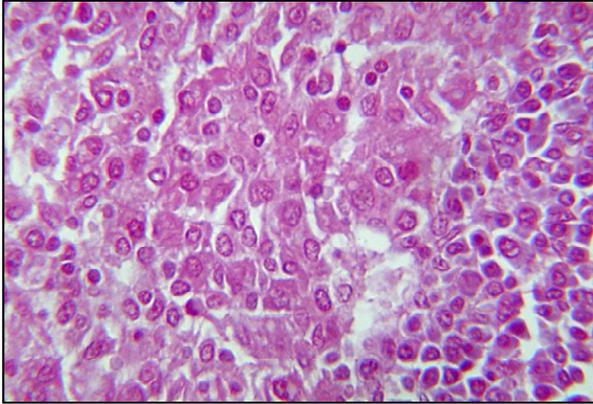
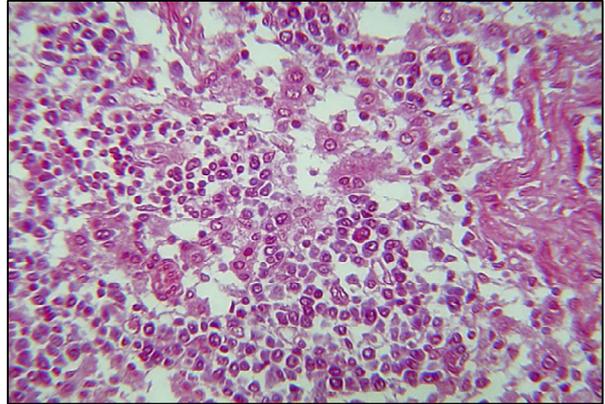


Fig.4



7. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que é possível detectar DNA de *Brucella abortus* desde o segundo até o último mês de gestação em bubalinos, tanto nos líquidos fetais quanto nos tecidos e mostra a transmissão intrauterina como rota de infecção na cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos. A presença de DNA de *Brucella abortus* foi detectada em todos os grupos de linfonodos avaliados a partir do quarto mês de gestação das búfalas, sendo que os linfonodos mais acometidos foram os mamários. Os achados anatomopatológicos significativos foram placentite fibrinopurulenta e necrótica e endometrite supurativa crônica. Diagnosticou-se linfadenite aguda e crônica ao exame histológico.