

**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Ana Patrícia Moreira Pereira

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) VACINADOS  
PELA CEPA B19 DE *Brucella abortus***

Belém  
2013

Ana Patrícia Moreira Pereira

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) VACINADOS  
PELA CEPA B19 DE *Brucella abortus***

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.  
Área de concentração: Sanidade Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira  
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Belém  
2013

Ana Patrícia Moreira Pereira

**RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) VACINADOS  
PELA CEPA B19 DE *Brucella abortus***

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Sanidade Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira  
Orientador – Universidade Federal do Pará  
(UFPA)

---

Prof. Dr. Antônio Humberto Hamad  
Minervino  
Membro titular – Universidade Federal do  
Oeste do Pará (UFOPA)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Hilma Lucia Tavares Dias  
Membro titular – Universidade Federal do  
Pará (UFPA)

À minha família, meu esposo Robinson Eutemio Seleski e minha filha Maria Eduarda Pereira Seleski, pelo apoio, paciência, compreensão e confiança. Aos meus pais, irmãos e sobrinha com todo carinho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do NCADR, na pessoa dos coordenadores e discentes que nos conduzem na busca do conhecimento.

Ao Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira pela orientação competente, pelo conhecimento transmitido, conselhos, críticas enfim pela sua presença marcante.

Ao Prof. Dr. Alexandre do Rossário Casseb, pela co-orientação e conhecimento a mim transmitido, conselhos, críticas, paciência, e presença sempre que solicitada.

Ao Prof. Dr. William Gomes Vale, pelo incentivo, apoio, e colaboração sempre que solicitada.

À DEUS que me oportunizou a realização de mais esta etapa na vida em busca de conhecimento.

Ao meu esposo, Robinson Eutemio Seleski, que sempre me apoiou, compreendeu e me ajudou a seguir em busca deste sonho. A minha filha Maria Eduarda que sempre me recebeu com um sorriso quando retornei para casa, e me mostrou o quanto ela é especial em minha vida.

A minha mãe, irmãos e sobrinha pelo apoio incondicional e de todas as formas sempre que foi necessário.

Ao Sr. Adinor Batista e Sr. Paulo que acreditaram e confiaram em mim ao disponibilizar os animais e suas propriedades que me acolheram ao longo dos meses de coleta.

À minha amiga Denise Torres e sua família que me acolheram e supriram por diversas vezes a saudade que senti de minha família.

As Faculdades Integradas do Tapajós – FIT na pessoa de meu diretor geral Professor Msc. Helvio M. Arruda e diretor de centro Professor Dr. Almir M. da Rocha pelo apoio e compreensão em todos os momentos que necessitei me ausentar em busca do conhecimento.

A todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta dissertação.

“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado. A saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”.

Louis L. Amour

## RESUMO

A brucelose está distribuída em todo território nacional, com maior prevalência para a espécie *Brucella abortus* que apesar de ser endêmica, apresenta-se de forma heterogênea entre as diferentes regiões do Brasil. O presente estudo tem por objetivo avaliar a resposta imune humoral de bezerras bubalinas criadas na Mesorregião do Médio Amazonas, vacinadas com a cepa B19 de *B. abortus* na idade preconizada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Foram selecionadas e acompanhadas 36 fêmeas (grupo teste) e 6 machos (grupo controle) com idades entre 3-8 meses. No dia 0 foi coletado sangue de todos os animais, em seguida todas as fêmeas receberam vacina comercial com amostra B19 em dose padrão conforme orienta o PNCEBT, com posteriores coletas de sangue realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 330, 360 e 390 dias. Os soros sanguíneos foram avaliados pelo soro aglutinação das provas de triagem: Antígeno Acidificado Tamponado - AAT e pela prova confirmatória: 2 Mercaptoetanol - 2ME. Os resultados obtidos para todas as amostras coletas no dia 0 apresentaram resultado negativo na reação. Aos 30 e 60 dias todas as fêmeas apresentaram 100% de reação na prova AAT e titulação de 1:200, iniciando o declínio da titulação aos 90 dias nas duas provas. Aos 210 dias as fêmeas ainda reagentes apresentaram resultados similares nas duas provas, tendo apenas um animal se mantido reativo nas duas provas até 360 dias e, somente aos 390 dias 100% das fêmeas obtiveram reação negativa nas duas provas, durante todo o experimento os machos foram não reativos. Assim, pela avaliação dos resultados, a vacinação mostrou-se 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.

**Palavra chave:** Brucelose. Bubalinos. Vacina B19. Soro aglutinação. Resposta imune.

## ABSTRACT

Brucellosis is spread throughout the country, with the highest prevalence for the strain *Brucella abortus* that despite being endemic presents unevenly among different regions of Brazil. This study aims to evaluate the humoral and immune response of buffalo calves raised in the Middle Amazon Mesoregion, Pará state, vaccinated with B19 strain of *B. abortus* according the age recommended by the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT). Thirty-six female (test group) and six males (control group) aged 3-8 months were selected and monitored. On day 0 of the experiment, blood was collected from all animals, then all females received commercial vaccine with standard-dose sample B19 as recommended by PNCEBT with subsequent blood samples were taken at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 330, 360 and 390 days, respectively. The blood serums were evaluated for evidence of agglutination screening through Buffered Acidified Antigen - AAT and the confirmatory test through 2 Mercaptoethanol - 2ME. The results for all samples collected on day 0 were negative in the reaction, however at 30 and 60 days all females were 100% positive through test reaction AAT and titration 1:200, starting the decline through the titration at 90 days in both events. Females at 210 days still present reagents with similar results in both tests, however only one animal remained reactive in both tests up to 360 days. After 390 days of the begin of the experiment 100% of the females had a negative reaction in both events and throughout the experiment males were negative. Thus, by the evaluation of results, vaccination was effective for immunization, as well as an important tool in the prophylaxis of brucellosis in the species studied, as well as the tests applied to the diagnosis of this disease in buffaloes species at regional level.

**Keyword:** Brucellosis. Buffaloes. B19 vaccine. Agglutination test. Immune response.



## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 -	Situação atual dos estudos da situação epidemiológica da brucelose no Brasil .....	23
Quadro 1 -	Resistência de <i>B. abortus</i> em condições ambientais .....	25
Figura 2 -	Marcação a ferro no membro posterior esquerdo para identificação dos animais do estudo .....	41
Figura 3 -	Localização de Monte Alegre no Estado do Pará .....	42
Figura 4 -	Marcação a ferro na face esquerda após vacina B19 e identificação dos animais com brincos .....	43
Figura 5 -	Coleta de sangue realizada na jugular de bezerro experimental no dia 0 (zero) .....	44
Figura 6 -	Prova do AAT com animal reagente (á esquerda), e animal não reagente (á direita) .....	45
Figura 7 -	Prova do 2-ME com animal reagente (á esquerda) e animal não reagente (á direita) .....	46
Figura 8-	Percentual de animais reagentes nas Provas AAT, SAL e 2-ME, após vacinação contra brucelose.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos testes AAT e 2-ME, apresentada por 36 fêmeas vacinadas com cepa B19 de <i>Brucella abortus</i> , após a vacinação .....	47
Tabela 2 - Resultados da evolução dos títulos de anticorpos vacinais da cepa B19 de <i>B. abortus</i> , em 36 fêmeas do dia zero, aos 390 dias após a vacinação .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2- ME</b>	Teste 2 Mercaptoetanol
<b>ADEPARÁ</b>	Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará
<b>AAT</b>	Antígeno Acidificado Tamponado
<b>c-Elisa</b>	Teste de Elisa Competitivo
<b>CTL</b>	Citotóxicos
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FC</b>	Fixação de Complemento
<b>FDA</b>	Teste de Polarização de Fluorescência
<b>FIT</b>	Faculdades Integradas do Tapajós
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>IDESP</b>	Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Produtivo
<b>IEA</b>	Instituto Ecológico Aqualung
<b>I-Elisa</b>	Teste de Elisa Indireto
<b>IgM</b>	Imunoglobulina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarideo
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>OIE</b>	Organização Mundial de Saúde Animal
<b>PCR</b>	Teste de Reação em cadeia de polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PNCEBT</b>	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal
<b>RENARGEN</b>	Rede Nacional de Recursos Genéticos
<b>SAL</b>	Teste de Soro aglutinação lenta em Tubos
<b>TAL</b>	Teste do Anel do Leite
<b>TE</b>	Transferência de Embrião
<b>TECPAR</b>	Instituto Tecnológico do Paraná
<b>Th</b>	Linfócitos T-auxiliares
<b>UFRA</b>	Universidade Federal Rural da Amazônia
<b>F</b>	Frequência

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
3.1 HISTÓRICO DOS BÚFALOS NA AMAZÔNIA	17
3.2 BRUCELOSE	18
3.3 HISTÓRICO	18
3.4 ETIOLOGIA	19
3.5 EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA	20
3.6 SITUAÇÃO DA BRUCELOSE NO BRASIL	22
3.7 PERDAS ECONÔMICAS	24
3.8 RESISTÊNCIA	25
3.9 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO E FATORES DE RISCO	26
3.10 PATOGENIA	27
3.11 RESPOSTA IMUNOLOGICA	28
3.12 SINTOMAS CLÍNICOS E LESÕES	30
3.13 DIAGNÓSTICO	30
3.13.1 TESTES DE TRIAGEM	31
3.13.1.1 TESTE DO ANTIGENO ACIDIFICADO TAMPONADO - AAT	31
3.13.1.2 TESTE DO ANEL EM LEITE – TAL	32
3.13.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS	32
3.13.2.1 TESTE DO 2 MERCAPTOETANOL (2-ME) E SOROAGLUTINAÇÃO LENTA (SAL)	32
3.13.2.2 TESTE DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO (FC)	33
3.14 OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	34
3.14.1 TESTE DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) INDIRETO (i-ELISA)	35
3.14.2 TESTE DE ELISA COMPETITIVO (c-ELISA)	35
3.14.3 TESTE DE POLARIZAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA (FPA)	35
3.14.4 TESTE DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE - PCR	36

3.15 CONTROLE E PROFILAXIA – VACINAS	36
3.15.1 VACINA B19	38
3.15.2 VACINA RB51	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1 ANIMAIS	41
4.2 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS	41
4.3 IMUNIZAÇÃO	42
4.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS	43
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	44
4.6 TESTES SOROLÓGICOS	45
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária mundial é um dos setores da economia que há varias décadas sofre com as perdas causadas pela brucelose, doença de grande impacto na produção e reprodução animal e que tem como sintomas em fêmeas bovídeas, abortamento no terço final da gestação, retenção de placenta, e repetição de cio; a brucelose é também uma zoonose e tem como agente etiológico as bactérias do gênero *Brucella* (PAULIN, 2003; FERREIRA NETO, 2009). A espécie *Brucella abortus* acomete preferencialmente bovinos e bubalinos, e apresenta biovariedade 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9 e a estirpe da vacina B19 (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; FIGUEIREDO, 2008; MINHARRO et al. 2009).

Segundo informativo do Instituto Ecológico Aqualung (IEA) (RAMOS, 2009) o Brasil apresenta posição de destaque e preocupação na esfera ambiental, pois é considerado o segundo maior produtor mundial e o maior exportador de carne, onde a Amazônia Legal possui grande relevância devido apresentar um rebanho com crescimento com o triplo da média nacional, sendo que para cada quatro animais acrescidos no rebanho nacional nos últimos cinco anos, três são originados da Amazônia.

O Estado do Pará possui 65% do rebanho bubalino do Brasil (PAULIN et al. 2006) com condições propícias à pecuária apresentando muitas chuvas, temperaturas elevadas e grandes extensões territoriais, que favorecem o crescimento de gramíneas para a alimentação animal (MINERVINO et al. 2008), mas apresenta sanidade deficiente, com reflexo direto na economia da região pelo descarte de animais acometidos por doenças, dentre elas está a brucelose (BARBOSA, 2005).

No Brasil, o levantamento realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), entre os anos de 2001 a 2004, revelou que a brucelose encontra-se disseminada em todo território nacional, havendo diferença na prevalência entre as regiões e inclusive dentro das mesmas (FERREIRA NETO, 2009). Objetivando a redução da prevalência desta enfermidade, o território nacional conta com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) instituída em 2001 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que apresenta como uma das principais medidas a vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas com idade de três a oito meses, com uso de provas sorológicas para identificação e eliminação dos animais reagentes (BRASIL, 2006).

Nardi Junior et al. (2012) referem ao conceito equivocado sobre a espécie bubalina tida como resistente a doenças que acometem os bovinos, sendo este um fator que dificulta o controle da brucelose nesta espécie, bem como o sistema de criação, que segundo Lourenço Junior e Garcia (2008) é desenvolvido de maneira extensiva ou semi-extensiva, com o uso de pasto nativo e/ou cultivados.

Estudos a cerca da brucelose bubalina são raros, especialmente na região Amazônica, nesse sentido, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a resposta imune humoral de bezerras bubalinas criadas na Mesorregião do Médio Amazonas, vacinadas na idade preconizada pelo PNCEBT com a cepa B19 de *B. abortus*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a resposta imune humoral de bezerras bubalinas (*Bubalus bubalis*) vacinadas pela cepa B19 de *Brucella abortus*.

### 2.2. ESPECÍFICOS

Quantificar a resposta imune humoral de bubalinos na vacinação contra brucelose com a cepa B19;

Monitorar fêmeas bubalinas vacinadas com a cepa B19 de *B. abortus*, e a cinética dos títulos pós-vacinação;

Avaliar através do perfil sorológico de fêmeas bubalinas vacinadas a possibilidade de reduzir o tempo de 24 meses previsto para o re-teste pelo PNCEBT.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. HISTÓRICO DOS BUBALINOS NA AMAZÔNIA

De acordo com Rosa et al. (2007) a introdução dos bubalinos na Amazônia deve-se a importação realizada pelo Dr. Vicente Chermont de Miranda, há mais de um século, tendo sido introduzidos na região do Marajó animais oriundos da Itália.

Segundo Egito, Mariante e Albuquerque (2002) a primeira raça introduzida foi a Mediterrânea, sendo depois realizada a importação de outras raças de búfalos, originários da Itália e da Índia, sendo elas: Jafarabadi, Murrah, Carabao e o Baio.

Atualmente a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos reconhece oficialmente a criação no território nacional de quatro raças: Carabao, Murah, Jafarabadi, Mediterrâneo. Para Cassiano et al. (2004) a adaptação dos búfalos na região norte, deu-se pela semelhança do clima tropical encontrado nesta região com relação ao país de origem.

Na Amazônia os búfalos são explorados como produtores de carne, leite e utilizados para o trabalho, sendo considerados animais ecológicos devido a sua capacidade de se adaptar e aproveitar as áreas com pastagens nativas e de difícil acesso por outros animais (LOURENÇO JUNIOR; GARCIA, 2008).

A bubalinocultura na Amazônia possui um sistema de manejo diversificado e que se adequa as condições econômicas e sociais de acordo com o sistema de produção. O manejo sanitário e zootécnico ainda apresenta-se deficiente e de baixo nível tecnológico sendo empregado pelos pequenos e médios criadores (LOURENÇO JUNIOR; GARCIA, 2008).

No Pará a bubalinocultura encontra-se concentrada em regiões de várzeas do rio Amazonas e na Ilha de Marajó, mas sua importância na economia do estado tem aumentado, porém o aproveitamento da matéria prima oriunda destes animais ainda é deficiente (SOUSA et al. 2002).

Marques et al. (2006) alerta para os riscos que a bubalinocultura enfrenta com relação à deficiência em manejo reprodutivo, pois a qualidade genética da espécie não possui programas direcionados para qualidade da espécie apesar da dupla aptidão para produção de carne e leite, bem como sua exploração como transporte e animal de tração.

Para Mariante et al. (2005) das raças de búfalos criadas no Brasil, a Carabao e Baio encontram-se ameaçadas de extinção tendo sido inclusas recentemente no

programa de conservação e uso de recursos genéticos de animais, através da Rede Nacional de Recursos Genéticos (Renargen).

De acordo com Rosa et al. (2007) a produção de búfalos encontra-se distribuídas em todas as regiões brasileiras, apresentando esta espécie um crescimento anual acima de 12% o que representa cinco vezes mais que o crescimento do rebanho bovino.

Cassiano et al. (2003) relata que os búfalos criados na região Amazônica apresentam características produtivas adaptadas as condições da região, sendo uma importante opção aos produtores locais.

### 3.2. BRUCELOSE

A brucelose é uma doença zoonótica de distribuição mundial e importância socioeconômica e que recebeu varias designações ao longo de sua história, a saber: aborto infeccioso, febre de malta; doença de bang; aborto contagioso (FAGIOLO et al. 2005). Esta enfermidade é causada por uma bactéria do gênero *Brucella*. Atualmente encontram-se descritas nove espécies deste gênero (FOSTER et al. 2007; POESTER et al. 2009).

Em bovinos e bubalinos a espécie *Brucella abortus* constitui o principal agente etiológico (CAPORALE et al. 2010). A importância da enfermidade advém dos problemas na saúde pública e por produzir perdas econômicas, visto que os rebanhos acometidos pela doença apresentam: abortamento, retenção de placenta e maior intervalo entre partos nas fêmeas (PAULIN, 2003).

### 3.3. HISTÓRICO

A evolução histórica da brucelose iniciou em 1859 quando foi identificada por Maston após contaminar-se. Em 1886, David Bruce isolou pela primeira vez a bactéria e a denominou de *Micrococcus melitensis*, este fato ocorreu após o óbito de vários militares acometidos pela doença, que se encontravam na Ilha de Malta, localizada ao sul da Sicília na Itália. Para identificar a enfermidade em 1879, os pesquisadores Wright e Smith desenvolveram o teste de soro aglutinação lenta em tubos (SAL).

Outro fato importante na sua evolução foi à criação do gênero *Brucella* proposto por Mayer e Cotton em 1911, a partir deste gênero já foram identificadas nove espécies,

acometendo alguns grupos animais, além do homem (MONTEIRO, 2004; PAULIN; FERREIRA NETO, 2008; XAVIER et al. 2010).

Em 1948, na proximidade do município do Cairo, foi isolado por Zaki pela primeira *B. abortus* no leite de vacas búfalas (GENTILE, 1957 *apud* PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

No Brasil, em 1913 foi registrado o primeiro caso humano da doença. (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002). Danton Seixas identificou a brucelose bovina em 1914 no Estado do Rio Grande do Sul (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008) sendo o primeiro ensaio sobre a brucelose no Brasil realizado por Tinécio Icibaci em 1922 (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008) e foi isolada em 1928 por Mello e Neiva no sangue de uma fêmea bovina após aborto (PAULIN; FERREIRA NETO, 2002).

*B. melitensis* encontra-se confirmada sua existência na Argentina e Peru, mas no Brasil esta espécie ainda não foi isolada (RIET-CORREA et al. 2007).

No Brasil, o primeiro relato da bactéria em búfalos foi realizado na década de 60, através de soro-aglutinação rápida em placa (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

### 3.4 . ETIOLOGIA

A bactéria do gênero *Brucella* é gram negativa, intracelular facultativa apresenta-se como um cocobacilo não esporulado (FAGIOLO et al. 2005; SANTOS, 2007) e que pode parasitar diversas espécies inclusive o homem. Cada espécie possui seu hospedeiro favorito, mas podem acometer outras espécies (PAULIN, 2003). O gênero encontra-se descrito com nove espécies: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti* e *B. pinnipedialis* (FOSTER et al. 2007). Possui classificação antigênica em lisas e rugosas. Representando as bactérias lisas estão a *B. abortus*, *B. suis*, e *B. melitensis*, e como bactérias rugosas *B. ovis* e *B. canis*.

Segundo Foster et al. (2007), a *B. ceti* e a *B. pinnipedialis* promovem a brucelose nos mamíferos marinhos, e as espécies *B. neotomae* e *B. microti* foram identificadas em roedores silvestres.

Tiller et al. (2010) identificaram *B. inopinata*, em uma mulher portadora de implante mamário e em um paciente com histórico de pneumonia. De acordo com Schlabritz-Loutsevitch et al. (2009) uma nova espécie foi isolada após abortamento em útero de babuínos, mas ainda não foi classificada.

Para bovinos e bubalinos, *B. abortus* é considerada o principal agente etiológico, mas estas espécies podem ser acometidas pela *B. suis* e *B. melitensis* (KOLODA, 2005; BRASIL, 2006; CAPORALE et al. 2010).

A brucelose em humanos tem como principal agente etiológico *B. melitensis*, mas o homem pode também ser contaminado pela *B. abortus*, *B. suis*, dentre outras (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

### 3.5. EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

A brucelose está distribuída em todo território nacional, com maior prevalência para a espécie *B. abortus* (LAGE et al. 2008). Para Paulin e Ferreira Neto (2002) a brucelose apesar de ser endêmica apresenta-se de forma heterogênea entre as regiões do Brasil. Segundo Koloda (2005) esta enfermidade encontra-se controlada e ou erradicada em alguns países da Europa, EUA, Canadá, e países nórdicos (Dinamarca, Suécia, Finlândia, Islândia, Noruega e outros).

No Paquistão esta enfermidade encontra-se presente em grandes rebanhos de leite, sendo diagnosticada através de sorologia realizada pela iniciativa privada e pública que se preocupam com a situação precária da saúde e das condições rurais nas fazendas e províncias (ABUBAKAR; MANSOOR; ASRHED, 2012).

Minharro et al. (2009) em estudo realizado no Brasil identificaram as biovariedades de *B. abortus*, sendo confirmada a existência das biovariedades: 1; 2; 3; 4; e 6 no rebanho bovino, com as respectivas prevalências: 52,5%, 11,7%, 20,4%, 0,7% e 14,6%. Nesse estudo a biovariedade 1 foi descrita em todos os estados, a biovariedade quatro, apesar de baixo percentual, nunca havia sido identificada no Brasil, e a biovariedade 6 foi identificada em todo território nacional, exceto no Estado de Santa Catarina, mas apresentou maior prevalência no Estado do Pará.

Megid et al. (2005) identificaram características das biovariedades de *B. abortus*, em quatro fetos bovinos e um bubalino. O biótipo 1 foi identificado nos fetos bovino e bubalino, o biótipo 2 e 3 estavam presentes somente nos fetos bovinos, esta foi à primeira descrição de biótipo isolada em feto bubalino.

Silva et al. (2009) realizaram estudo sobre a situação epidemiológica da brucelose no Estado de Sergipe, não tendo sido incluído neste estudo bubalino apesar da ocorrência dos mesmos na região, os resultados obtidos indicaram que quanto maior a propriedade maiores são as chances da ocorrência da enfermidade, e principalmente nas

que possuem atividade mista, este fato está relacionado a frequente introdução de novos animais e ao manejo sanitário deficiente, influenciando assim na dinâmica da doença.

Nascimento et al. (2005) descreveram os aspectos epidemiológicos da *B. abortus*, e consideram que o diagnóstico da enfermidade deve ser sorológico ou bacteriológico, não havendo tratamento aos animais soro reagentes, devendo os mesmos ser submetidos ao sacrifício.

Fosgate et al. (2002) levantaram a suposição de que a epidemiologia da enfermidade seja distinta entre bovinos e bubalinos, reforçando a necessidade de estudo na espécie bubalina, visto que a maioria da literatura refere-se aos bovinos.

Em relação aos mamíferos silvestres, Paulin (2003) comenta que os ungulados silvestres representam importantes reservatórios na cadeia epidemiológica da brucelose, pois são responsáveis em manter esta doença no meio ambiente.

Estudo realizado por Silva et al. (2001) descreveram a ocorrência de brucelose, tuberculose e leptospirose em caititu (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro, tendo os mesmos identificados dentro do grupo de 41 animais do estudo, dois animais machos positivos para brucelose, sendo descrito pelos autores a possibilidade da contaminação ter ocorrido em vida livre, visto que os mesmos foram colocados em cativeiro pouco tempo antes do estudo.

Para Lawinsky et al. (2010) que realizaram revisão bibliográfica a cerca da brucelose em humanos, apontam esta enfermidade como uma ameaça biológica, visto que a mesma é uma zoonose capaz de causar danos irreparáveis a saúde, e chamam a atenção dos sistemas de saúde para esta ameaça, devendo os mesmos investir na busca de uma vacina eficaz na prevenção da doença no homem. Em concordância com este autor, Faria (2010) e Yang et al. (2013) apontam a brucelose como um agente potencial ao bioterrorismo.

Em humanos a brucelose está relacionada diretamente á atividade profissional, sendo mais acometidos médicos veterinários, tratadores, proprietários, laboratoristas, magarefes, vaqueiros, dentre outros, pois lidam diretamente com os animais e ou material contaminado. Normalmente a bactéria que mais acomete os humanos é *B. abortus* por estar presente em animais de produção (RIET-CORREA et al. 2007; LAWINSKY et al. 2010; NARDI JUNIOR et al. 2012). Para os autores a contaminação no homem dá-se principalmente pelo contato direto com sangue, restos placentários, fetos abortados, procedente de animais domésticos, inclusive pelo consumo de leite *in natura* e derivados contaminados.

Pessegueiro, Barata e Correia (2003) concluíram em estudo que o número de casos de brucelose em humanos seja cinco vezes maior que os identificados oficialmente, em virtude da falta de diagnóstico e ou o não cumprimento da comunicação obrigatória. A distribuição geográfica em humanos coincide com a dos animais, e para diagnóstico a soro aglutinação é recomendada precocemente na forma aguda, com a indicação do teste de Elisa para a forma crônica e doença ativa.

O tratamento em humanos utiliza altas doses de antibióticos por tempo prolongado, possuindo riscos de recaídas (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003; FAGIOLO et al. 2005; YANG et al. 2013). Autores afirmam que a prevenção da doença em humanos está intimamente ligada ao controle e erradicação da mesma nos animais, não havendo ainda vacinas eficazes para o homem (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003; LAWINSKY et al. 2010). Para Miranda (2009) o leite de animais vacinados com a amostra RB51 não representa um problema de saúde pública, devido os animais não ser vacinado no período periparto, mas é recomendado o consumo de leite pasteurizado.

### 3.6. SITUAÇÃO DA BRUCELOSE NO BRASIL

A brucelose bovina encontra-se distribuída em todo território nacional. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, realizou inquérito sorológico no ano de 1975 em vários estados brasileiros, com os resultados pode-se observar a prevalência da brucelose nas unidades federativas (LAGE et al. 2008).

Baseado neste inquérito sorológico Paulin e Ferreira Neto (2002) ressaltaram que nos Estados do Pará, Sergipe e Paraná, foram identificados índices de prevalência da brucelose em 11,6%, 10,5% e 9,9% dos rebanhos, respectivamente, já os estados com menor incidência foram o Piauí e Santa Catarina com 0,2%, o Ceará com 0,6% e o Rio Grande do Norte e a Paraíba com 0,8%, respectivamente.

Visando combater esta zoonose, em 2001 o Governo Federal através da Instrução Normativa (IN) nº 02, do MAPA aprovou Regulamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, que tem por objetivo conseguir diminuir a prevalência e a incidência da brucelose e tuberculose em todo território nacional. Neste mesmo programa encontram-se previstas estratégias para obtenção e controle da brucelose, onde um dos pontos previsto é a vacinação de bezerras na idade de 3 a 8 meses com a vacina B19 (BRASIL, 2001).

Logo após instituir o PNCEBT, o MAPA realizou parcerias importantes com instituições de ensino, a fim processar os exames do inquérito soro-epidemiológico. A participação dos estados brasileiros neste inquérito deu-se por adesão (Figura 1), desta forma os estados não seriam obrigados a participar do inquérito, o Estado do Mato Grosso do Sul aderiu participação no inquérito, mas deliberou fazer uso dos resultados de um inquérito anterior realizado em 1998 (FERREIRA NETO, 2009).

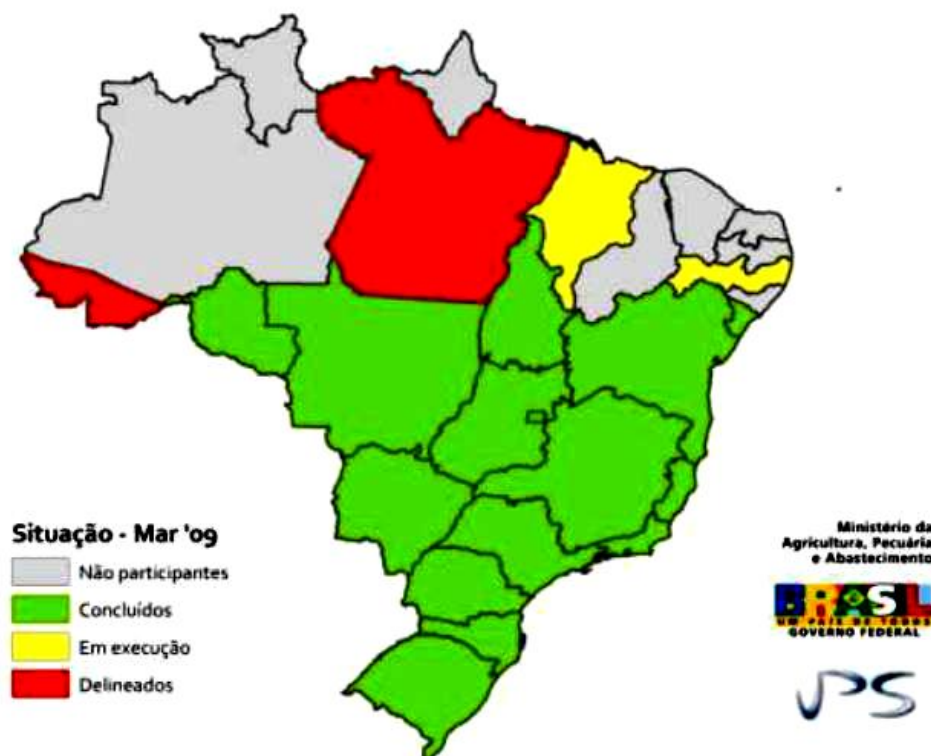


Figura 1: Situação atual dos estudos da situação epidemiológica da brucelose no Brasil (Ferreira Neto, 2009).

De acordo com o último inquérito, soro-epidemiológico, as regiões com característica para produção de carne detêm o maior índice da doença, mas algumas regiões como o Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina aprestaram índices baixos e invejáveis em relação às demais regiões do Brasil. Neste mesmo inquérito, com bastante relevância encontra-se o Estado de Minas Gerais que através dos programas de vacinação de bovinos e bubalinos desde o ano de 1993, apresenta alterações nos índices de ocorrência da enfermidade que sofreram significativa redução (FERREIRA NETO, 2009).

Mendes et al. (2009) através de estudo de prevalência de doenças reprodutivas no rebanho bovino de Uberaba - MG confirmaram e concluíram que a brucelose

encontra-se controlada e com baixa prevalência, em decorrência da vacinação e medidas previstas no PNCEBT.

Galindo et al. (2010) verificaram que o Estado de Sergipe apresentou redução no número de casos de brucelose bovina em seu rebanho após a introdução das medidas previstas pelo PNCEBT, mas que as medidas preventivas deverão ter continuidade para que o potencial pecuário da região possa ser mais valorizado.

No Estado do Tocantins, região de Araguaína, Ramos et al. (2010) observaram que a brucelose encontra-se disseminada no rebanho bovino leiteiro, sendo necessária a inclusão de programa que inclua a vacinação, controle no trânsito de animais e a quarentena.

Após a realização deste inquérito em 2004, o Estado de Santa Catarina através de portaria nº 11 de 2004 do MAPA, foi excluído da obrigatoriedade da vacinação de bezerras conforme preconiza o programa, devido aos baixos índices apresentados (BRASIL, 2009).

Minervino et al. (2011) através de estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos reagentes à brucelose no Estado do Pará, obteve resultados que indicam que a doença encontra-se disseminada em todo o estado, e sugere a conscientização de proprietários e profissionais no controle desta enfermidade na região.

### 3.7. PERDAS ECONOMICAS

Paulin e Ferreira Neto (2008) estimam que os impactos na economia deixada pela brucelose giram em torno de 10 a 15% na produção de carne e 24% na produção de leite. Na esfera reprodutiva o aumento do tempo entre partos encontra-se em torno de 11,5 a 20 meses, com redução de 15% nos partos a termo, e para a bubalinocultura a previsão é que ocorra o mesmo.

Anualmente, no Brasil calculam-se perdas em torno 100 milhões de dólares com bovinos e bubalinos acometidos por brucelose (FOLHA DE SÃO PAULO, 2000 *apud* NARDI JUNIOR, 2012).

Jorge (2005) destaca que no oriente a China, Índia, e o Paquistão são os países que se destacam na produção de carne bubalina, e no ocidente o Brasil, assume esta posição sendo favorecido pela sua extensão territorial e por possuir clima e solo favoráveis, se exibindo a médio e longo prazo como o maior produtor de carne bubalina em termos quantitativos e qualitativos.



Abubakar, Mansoor e Asrhed (2012) destacam a brucelose como uma doença devastadora no Paquistão, por tratar-se de uma zoonose presente em países onde a zona rural depende basicamente da criação de gado e dos produtos do leite, principalmente por possuírem infraestrutura precária a esta atividade, produzindo riscos à saúde animal e humano, conseqüentemente apresenta impactos sócio econômico.

### 3.8. RESISTÊNCIA

No meio ambiente, a bactéria do gênero *Brucella* se apresenta sensível a desinfetantes como: cresóis, fenóis, cal, dentre outros, mas, para que os mesmos atuem terão que ser utilizados nas diluições indicadas para uso em fômites e ambientes contaminados e, se possível, fazer uso da luz solar que é também um potente germicida natural (BRASIL, 2006). A pasteurização e as radiações ionizantes são citadas por Leite e Bastianetto (2009) como um bom método de destruição da *Brucella*. O Quadro 1 reúne informações sobre a resistência da *B. abortus* citada por vários autores (FIGUEIREDO, 2008).

Condição Ambiental	Tempo de sobrevivência	Fonte
<b>Luz solar direta</b>	4 - 5 horas	Brasil, 2006.
<b>Solo</b>		
Seco	1 - 2 meses	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
Seco	4 dias	Brasil, 2006.
Úmido	66 dias a 100 dias.	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
Baixas Temperaturas	151 - 185 dias.	Brasil, 2006.
<b>Fezes Bovinas</b>		
Secas (Esterco)	1-5 dias (verão), 53 dias (inverno)	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
Úmidas	3 - 4 meses	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
<b>Dejetos</b>		
Esgoto	8 - 240 / 700 dias	Brasil, 2006.
Altas Temperaturas	4 horas/ 2 dias	Brasil, 2006.
<b>Água</b>		
Potável	5 - 114 dias	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
Poluída	30 - 150 dias	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
<b>Feto á sombra</b>	180 dias	Brasil, 2006.
<b>Exsudato uterino</b>	200 dias ou mais	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
<b>Instalações úmidas e Escuras</b>	4 meses	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
<b>Leite</b>		
62,8°C - 65,6°C *	30 minutos	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
71,7°C **	15 segundos	Paulin e Ferreira Neto, 2003.
Fervido	Morte Imediata	Paulin e Ferreira Neto, 2003.

Quadro 1 - Resistência da *B. abortus* e condições ambientais.

Pasteurização Lenta (\*) Pasteurização Rápida (\*\*)

Fonte: Figueiredo (2008)

### 3.9. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO E FATORES DE RISCO

A transmissão da brucelose ocorre de forma semelhante em bovinos e bubalinos, através de material contaminado em contato direto com as mucosas da genitália, mucosa oral, trato nasal, mucosa ocular e pele. O leite *in natura* de animais contaminados são fontes de infecção aos bezerros e ao homem. A forma extensiva de criação dos búfalos e o manejo devem ser levados em consideração para avaliar a transmissão (PAULIN, 2003; LAGE et al. 2008).

A fêmea bovina e/ou bubalina infectada representa a maior fonte de disseminação da brucelose, através dos restos placentários, fetos abortados, pois podem contaminar o meio ambiente (BRASIL, 2006).

A reprodução através da monta natural não apresenta riscos de contaminação em virtude de a mucosa vaginal apresentar defesas naturais que dificultam a infecção. Mas, com o advento da tecnologia na reprodução animal, o sêmen contaminado utilizado para inseminar poderá infectar a fêmea devido o mesmo ser depositado no útero. Já a transferência de embriões (TE) não apresenta riscos devido às lavagens e tratamento realizado para diminuir o risco de infecção nas receptoras (BRASIL, 2006).

Os equinos contaminados por *B. abortus* que apresentam supuração das lesões podem contaminar o homem pelo material eliminado. Alguns animais silvestres são considerados reservatórios da brucelose, e já foram relatados em alguns países (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). No Brasil animais silvestres como queixada foram identificados como soropositivos para a brucelose, provavelmente a contaminação entre os animais silvestres ocorra pela ingestão de restos de parto contaminados (BRASIL, 2006).

Gidlewski et al. (2000) relatam que camelos e dromedários são acometidos pela *B. abortus* na Ásia e Norte da África, sendo os mesmos testados com soro-aglutinação utilizados em bovinos, bem como a ocorrência de *B. melitensis* diagnosticada em lhamas do Jardim Zoológico de Londres. Estes autores realizaram experimentação com um grupo de lhamas infectadas por *B. abortus*, através de inoculação no saco conjuntival, objetivando observar os efeitos patológicos da mesma, visto que não consta na literatura relato desta ocorrência, e poderão observar o acontecimento de aborto em uma fêmea gestante, bem como na necropsia a presença de lesões em órgãos e tecidos característicos da enfermidade.

A contaminação do homem através do leite diminuiu após o uso da pasteurização, contudo a manipulação das vacinas B19 e RB 51 também representa um risco e devem ser manuseadas com Equipamentos de Proteção Individual - EPI (máscaras, luvas e óculos) (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A brucelose acomete animais em qualquer idade, mas a doença ocorre de forma mais comum em animais sexualmente maduros, principalmente no gado leiteiro (MUNIR, 2009).

As bezerras nascidas de mães soropositivas para brucelose podem infectar-se no útero ou logo após o parto. Estas bezerras apresentam infecção latente permanecendo as bactérias nos linfonodos, estes animais normalmente apresentam sorologia positiva durante a gestação e sofre aborto no primeiro parto, nesta situação a vacinação não obtém resultados (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

Diversos autores relatam situações que expõe e facilita a entrada da brucelose nos rebanhos. Dentro do manejo sanitário das propriedades citam-se situações como a introdução de animais sem testá-los, a introdução de animais sem realizar quarentena, a baixa taxa de vacinação dos rebanhos, a inseminação artificial sem qualidade sanitária, o sistema extensivo de criação que favorecem em algumas regiões do Brasil o contato direto entre os rebanhos (BARBOSA, 2005; DEL FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007; LAGE, et al. 2008; FERREIRA NETO, 2009; GALINDO et al. 2010; MOTA, 2011).

### 3.10. PATOGENIA

Após a entrada da bactéria que normalmente ocorre através da ingestão de pasto, água, e ou alimentos contaminados, a bactéria passa pelas mucosas sendo fagocitadas pelos macrófagos, e transportadas até os linfonodos. Nos linfonodos ocorre sua multiplicação, depois passam para corrente sanguínea e chegam a diversos tecidos do hospedeiro como o baço, fígado e linfonodos. Nos diferentes órgãos a bactéria pode produzir infecção e lesões articulares (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

Na vaca gestante, a *Brucella* chega à placenta por via sanguínea devido à presença do eritritol que é uma substância, com propriedades hormonais presente no útero grávido que representa um fator quimiotático que atrai as brucelas e funciona como fator estimulante para o seu crescimento. Com o avanço da gestação, eleva-se a produção do eritritol favorecendo a multiplicação da bactéria nos placentomas produzindo um processo inflamatório necrosante que prejudica a alimentação materno

fetal, produzindo abortamento (CARTER, 1991 *apud* PAULIN, 2003; BISHOP; BOSMAN; HERR, 1994).

Após este aborto, o animal desenvolve a imunidade celular na qual produzirá lesões menores no útero grávido, não ocorrendo novos abortamentos, mas tornando o animal portador e apresentando sintomas como a retenção de placenta e o nascimento de bezerros debilitados, dentre outros (CORREA; CORREA, 1992).

### 3.11. RESPOSTA IMUNOLÓGICA

As bactérias do gênero *Brucella* são intracelular facultativo e possuem capacidade de transpor barreiras imunológicas, através destas conseguem sobreviver, multiplicar-se mesmo após serem fagocitadas pelos macrófagos, fato este que dificulta ação dos antibióticos no combate e controle da enfermidade, fazendo com que a mesma apresente caráter crônico (MONTEIRO, 2004; CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005).

A resposta imune é descrita por Munhoz (2012) como a capacidade do organismo em reconhecer substâncias estranhas que penetram no organismo, fazendo com que o mesmo encontre mecanismos para tentar eliminá-lo.

O organismo possui dois tipos de resposta aos desafios enfrentados, à resposta imune mediada por células e a resposta imune humoral. A resposta imune mediada acontece após o organismo sofrer o desafio pela bactéria da brucelose e ocorre pela interação das células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), além dos linfócitos T auxiliares (Th) e citotóxicos (CTL) (MONTEIRO, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2005; FLORES, 2007; FREITAS, 2012). A resposta imune humoral é fundamental para os testes sorológicos, pois a composição química da bactéria e sua classificação antigênica representada pela morfologia lisa de algumas espécies encontram-se diretamente ligadas aos testes sorológicos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

Esta resposta somente é possível devido à morfologia das paredes da bactéria que possui um lipopolissacarídeo (LPS) em sua membrana externa, composta de três camadas, respectivamente, um glicofosfolípídio A, considerada uma endotoxina, um camada de oligossacarídeo central e a cadeia O, localizada na porção terminal, que é um homopolímero que somente está presente nas espécies lisas, sendo a porção responsável pelas respostas imunogênicas humorais pós-vacinal e em casos de infecções pela doença

(CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005; SMITS; KADRI, 2005; BRASIL, 2006; PAULIN; FERREIRA NETO, 2008).

Envolvida nesta resposta imunológica existem três imunoglobulinas, que se manifestam de acordo com a fase da enfermidade. Logo após a infecção e/ou vacinação a classe de isótipos IgM, IgG e a subclasse IgG1 aparecem, com níveis mais elevados. No caso de doença com o curso longo ocorre à baixa dos isótipos IgM, mas as IgG1 mantêm seus níveis altos. A classe dos isótipos IgA e IgG2 possuem resposta imune mais tardia e com níveis menores, mas conseguem manter seus níveis em todo o processo (MONTEIRO, 2004; SMITS; KADRI, 2005; BRASIL, 2006).

Com destaque na resposta humoral temos o isotipo IgG que se encontra intimamente ligado à resposta antigênica tanto nas infecções crônicas como nas iniciais. No caso da reação vacinal haverá a presença do isotipo IgM e IgG, porém a imunoglobulina IgG tende a desaparecer após seis meses da aplicação da vacina, isto quando a vacina é realizada no tempo correto (vacina B19 - três a oito meses). Em casos de vacina acima do tempo previsto, a resposta humoral irá perdurar por mais tempo, isto pode interferir nos testes sorológicos ocorrendo animais falsos positivos (MONTEIRO, 2004).

Alguns fatores devem ser levados em consideração para o sucesso na resposta imunológica das vacinas, para Brasil (2006), Souza, Soares e Ferreira (2009) e Flores (2012) fatores como falhas no tipo de adjuvante utilizado, a quantidade e qualidade da amostra, o armazenamento e outros. Fatores técnicos como a qualidade no local de aquisição da vacina, transporte, manipulação da vacina inadequada, dose, forma de aplicação e o local de aplicação, podem interferir na resposta imune, conseqüentemente, poderá produzir ou não os efeitos desejados na proteção dos animais, desta forma o PNCEBT instituiu através da IN nº06 de 2004, com o regulamento técnico do programa, que as vacinas contra brucelose e os testes sorológicos deverão ser realizados por médicos veterinários cadastrados e habilitados pelo MAPA, pois desta forma o programa prevê que as ações deverão acontecer de forma correta.

Pensando nestas situações Samara, Buzinaro e Carvalho (2004), realizaram estudo para verificar estes riscos na vacina utilizada para febre aftosa no Brasil, e concluíram que estes fatores interferem, mas são capazes de determinar resposta imunológica satisfatória pós-vacina nos animais.

Outros fatores inerentes ao organismo do animal também podem interferir na resposta imunológica como: estresse, organismos imunodeprimidos, escore corporal inadequado, ou animais em período de incubação da enfermidade (FLORES, 2007).

### 3.12. SINTOMAS CLÍNICOS E LESÕES

A sintomatologia nos bovinos e bubalinos encontra-se relacionada a problemas reprodutivos, produzindo abortamento no terço final da gestação, retenção de placenta, nascimento de bezerros fracos, repetição de cio e outros e nos machos produz orquite e epididimite (PAULIN, 2003; LEITE; BASTIANETTO, 2009; GALINDO et al. 2010; ABUBAKAR; MANSOOR; ASRHED, 2012).

O período de incubação desta enfermidade pode variar de 14 a 180 dias em bovinos, sendo a febre um sintoma presente nos animais contaminados (KOLODA, 2005).

As lesões observadas fora do aparelho reprodutor masculino e feminino são os higromas, bursites, artrites, abscessos, dentre outras (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; PAULIN, 2003). Estudo realizado por Freitas e Oliveira (2005) confirmou a presença de brucelose em bovinos e búfalos com bursite em matadouro e sugerem que animais identificados com este tipo de lesão durante inspeção sanitária sejam avaliados e julgados com bastante critério.

Rhyan et al. (1997) relatam a ocorrência de *B. abortus* nos bisões em Dakota do Sul, EUA, tendo sido observado em machos após o abate a presença de orquite e vesiculite.

Em bovinos contaminados experimentalmente e monitorados após abortamento ou parto as lesões identificadas foram placentite, pleurite e pericardite fibrinosa, broncopneumonia nos fetos abortados e mastite nas vacas (XAVIER et al. 2009).

No homem durante a fase aguda da brucelose, uma das principais características é a presença de febre contínua, fraqueza, mal-estar, dores musculares, impotência sexual, dentre outros sinais clínicos. Em casos graves podem ocorrer bursites, artrites e dores musculares, com a bactéria se alojando no fígado, baço e linfonodos (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; RIET-CORREA et al. 2007).

### 3.13. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico para brucelose pode ser feito de forma direta e ou indireta. O direto representa o isolamento do agente realizado em fetos abortados ou de seus órgãos, bem como no sangue da vaca e restos placentários, sendo viável apenas para o diagnóstico individual de brucelose, dada sua complexidade e altos custos não compensando sua realização em rebanhos (PELLEGRIN et al. 2003). Os autores orientam que o material para exame deva ser, devidamente acondicionado de forma individual e depois congelado ou resfriado, e que com o material deverá acompanhar o histórico do rebanho, da propriedade e do animal envolvido no episódio.

Os diagnósticos indiretos ou sorológicos constituem uma das bases para o atual PNCEBT, onde os rebanhos são testados e acompanhados, objetivando em períodos regulares resultados negativos nos rebanhos envolvidos nos inquéritos. Desta forma, serão emitidos certificados de validação para propriedades livres e/ou controladas com vacinação para Brucelose (BRASIL, 2006).

Dentro do programa atualmente vigente no Brasil, as provas sorológicas estão agregadas como testes de triagem e testes confirmatórios. São considerados testes de triagem o Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e o Teste do Anel do Leite (TAL); os testes confirmatórios em caso de animais soropositivos na triagem são o Teste 2-Mercaptoetanol (2ME), o Teste de Soro Aglutinação Lenta (SAL) e o Teste de Fixação do Complemento (FC) (BRASIL, 2006).

Segundo alguns autores a prova AAT é um bom teste de triagem para a espécie bubalina (PAULIN et al. 2006; PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). Da mesma forma que as provas c-ELISA e Polarização Fluorescente são referidas como auspiciosas a serem utilizadas como provas confirmatórias para uso na espécie bubalina devida sua especificidade (MOLNÁR et al. 2002; PAULIN et al. 2006).

### **3.13.1. Testes de triagem**

#### **3.13.1.1. Teste do Antígeno Acidificado Tamponado - AAT**

É considerada uma prova rápida e de alta sensibilidade e fácil execução. A solução de antígeno é preparada na concentração de 8%, tamponada em pH ácido (3,65) e corada com Rosa Bengala. Encontra-se classificado como uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos presente no soro testado, mas é capaz de identificar com maior precocidade as infecções recentes quando comparada a soro aglutinação

lenta em tubos - SAL (MEGID et al. 2000; PAULIN, 2003; CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005; SMITH; KADRI, 2005; BRASIL, 2006).

Neste teste ocorre uma reação com presença ou não de grumos que qualifica o resultado em positivo e ou negativo. O pH ácido permite que somente os isotipos da classe IgG1 aglutinem o antígeno. Neste teste podem ocorrer reações falso-positivas conforme colocações anteriores. As reações positivas neste teste devem ser confirmadas por teste de maior especificidade (PAULIN et al. 2002; BRASIL, 2006).

Pinto et al. (2005) avaliaram as provas AAT em relação as provas FC e 2-ME em soros de bubalinos infectados, e obtiveram resultado de 93,03% de sensibilidade na prova AAT em relação as demais, considerando esta prova de triagem de suma importância para que animais falso-negativos não sejam mantidos nos rebanhos o que seria prejudicial ao PNCEBT.

#### 3.13.1.2. Teste do Anel em Leite - TAL

Utilizado em mistura de leite de vários animais e tem por objetivo detectar rebanhos infectados. Pode ser utilizado para monitoramento de propriedades livres ou em controle de vigilância epidemiológica.

A solução de antígeno é preparada na concentração de 4% e corada com hematoxilina. Quando existem anticorpos no leite, eles reagem com o antígeno corado formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo, que é arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva). Quando não existem anticorpos no leite, o anel terá coloração branca e a coluna de leite permanecerá azulada (reação negativa). Podem ocorrer resultados falso-positivos em presença de leites ácidos, ou provenientes de vacas portadoras de mamite ou em início de lactação (BRASIL, 2001; BRASIL, 2006).

### 3.13.2. Testes confirmatórios

#### 3.13.2.1. Teste do 2-Mercaptoetanol - 2-ME e Soro aglutinação Lenta (SAL)

Estas provas tem sua especificidade aumentada pela inibição da atividade aglutinante do IgM devido ao processo químico realizado no soro com a droga 2-mercaptoetanol (PAULIN, 2003; CASTRO; GONZÁLEZ; PRAT, 2005).



Esta é uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro suspeito. Esta imunoglobulina indica o estado de infecção crônica. Considerado um teste específico, e é feito em paralelo com a soro aglutinação lenta (SAL). Utilizados para confirmar animais reagentes nos teste de triagem. Assim, soros com predomínio de IgM não apresentarão anticorpos suficientes para formação de grumos e a reação será considerada negativa nesta prova. Na prova de soro aglutinação lenta não há degradação dos isotipos IgM, e estes podem ser responsáveis pela formação de grumos que caracterizam a reação positiva (BRASIL, 2006).

Segundo Santos (2007) a prova acima utilizada como teste confirmatório do PNCEBT deve ser desenvolvida com antígeno de suspensão inativada de *B. abortus*, cepa 119-3 na concentração de 4,5. No teste de (SAL) será acrescido nos tubos a solução salina fenicada (0,5%) onde o antígeno diluído deverá apresentar-se na diluição de 1:100, e após mistura deverá se proceder discreta homogeneização.

De acordo com Brasil (2006) os resultados deverão ser interpretados desta forma comparativa entre os testes:

- Positivo para a prova lenta e negativa para 2-ME serão interpretados como reações não características ou devido a anticorpos residuais de vacinação com B19;
- Positivos nas duas provas indicam a presença de IgG, interpreta-se como animais infectados;

Nesta prova o tipo de aglutinação é determinado pela diluição. Sendo visualizadas e descritas como:

- **Resposta completa:** o líquido do soro com antígeno aparece límpido, e quando sofre discreta agitação os grumos são mantidos;
- **Resposta incompleta:** o líquido do soro com o antígeno aparece transparente, e quando sofre discreta agitação os grumos são mantidos;
- **Resposta negativa:** o líquido do soro com antígeno aparece opaco ou turvo, e quando sofre agitação não demonstra grumos. Aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

### 3.13.2.2. Teste de Fixação do Complemento - FC

Apesar desta prova ser considerada a melhor prova para confirmação da brucelose pela técnica de sorodiagnóstico, a mesma requer equipe qualificada, e

laboratório de ponta. Por isso a mesma é recomendada como prova confirmatória para animais positivos na triagem ou para diagnóstico de casos inconclusivos ao teste do 2-ME (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

Neste teste apesar do mesmo detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador de complemento. Animais infectados permanecem positivos por períodos mais longos e com títulos fixadores de complemento mais elevados do que nas provas de aglutinação. Em animais vacinados acima de oito meses de idade, os anticorpos que fixam complemento desaparecem mais rapidamente que os aglutinantes (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

Caso o soro sanguíneo do animal apresente o anticorpo correspondente à infecção, o complemento será fixado ao complexo antígeno-anticorpo específico, mas se o soro não contiver anticorpos específicos, o complemento permanecerá livre. Este teste é realizado em laboratórios oficiais credenciados para efeito de trânsito internacional de animais, sendo recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003; BRASIL, 2006).

O inconveniente desta prova são os resultados falsos - negativos que podem ocorrer em animais com infecções crônicas, ou em situações de reação cruzada pela presença de bactérias. Esta situação pode ocorrer em animais vacinados com vacina B19 acima da idade preconizada (BRASIL, 2006).

Faria (2010) em estudo com bovinos para avaliação testes sorológicos após vacinação com amostra B19, relata a perfeita concordância dos resultados nas provas FC e 2-ME, preconizadas pelo PNCEBT como provas confirmatórias.

Jardim (2003) avaliou comparativamente as provas sorológicas (ELISA, 2-ME, SAL, AAT) com a Fixação de complemento (FC) em bovinos, os resultados apontaram que das provas realizadas todas obtiveram 100% de sensibilidade, mas quando avaliada a especificidade os resultados obtidos em comparação a FC foi a seguinte: AAT, seguida de 2-ME e SAL, e por último ELISA. No entanto Meirelles-Bartoli e Mathias (2010) em estudo comparativo para as provas AAT, 2-ME e FC em bovinos e concluíram que a sensibilidade da prova AAT destacou-se com 99,6% seguida da 2-ME e depois a FC, mas a especificidade da prova foi 100% na prova FC, seguida da 2-ME e somente depois a AAT.

### 3.14. OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Os testes imunoenzimáticos encontram-se previstos para diagnóstico da brucelose. Estão divididos em ELISA indireto e competitivo. Estes testes apresentam especificidade e sensibilidade, mas sua realização necessita de um laboratório bem equipado e pessoal treinado para sua execução (PAULIN, 2003).

#### **3.14.1. Teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto (i-ELISA)**

Este teste apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo seu processamento ser todo automatizado (PAULIN, 2003).

O teste i-ELISA é sensível, mas não diferencia os anticorpos vacinais dos anticorpos produzidos pela enfermidade. Encontram-se disponíveis comercialmente, e são padronizados pela OIE sendo produzidos por laboratórios nacionais (OIE, 2000).

#### **3.14.2. Teste de ELISA competitivo (c-ELISA)**

Este teste apresenta alta especificidade e sensibilidade para diagnóstico de brucelose bovina, e possui a capacidade de diferenciar os animais vacinados dos que se encontram contaminados. Neste teste o conjugado pode ser utilizado para testar soros de diversas espécies (PAULIN, 2003).

Molnár et al. (2002) analisaram cerca de 1200 amostras sanguíneas de bubalinos, utilizando seis diferentes testes sorológicos no exame dessas amostras, que foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade e os resultados obtidos indicaram os testes de ELISA competitivo, ELISA indireto com conjugado antibovino de cadeia leve, e ELISA com conjugado contra IgG bovino, apresentam os melhores resultados, respectivamente, de 100% e 99,33%; 98,57% e 97,33%; 97,14% e 95,66%, contra as provas Teste AAT e Aglutinação rápida que obtiveram somente 91,42% e 94,00%; 79,28% e 86,33%, respectivamente.

#### **3.14.3. Teste de Polarização de Fluorescência (FPA)**

Esta prova apresenta-se de forma simples e rápida, sua resposta avalia a interação antígeno-anticorpo. Podendo ser realizada no soro e leite à campo e em laboratórios. O antígeno desta prova é produzido a partir de uma pequena amostra da cadeia “O” do lipopolissacarídeo da *B. abortus*, em conjunto com isoticianato de

fluoresceína. Sua leitura é realizada com o auxílio de um equipamento de iluminação por luz polarizada que determina a velocidade de rotação das moléculas (BRASIL, 2006).

Este teste foi aprovado para varias espécies como, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e outras e apresenta como vantagem a necessidade de pequenas porções de soro (PAULIN, 2003).

Faria (2010) avaliou a prova FPA para bovinos vacinados com a cepa B19 de *B. abortus*, e concluiu que a prova FPA apresenta concordância para identificação de títulos com relação às provas confirmatórias do PNCEBT, apresentando boa especificidade e considerando a mesma um importante instrumento para diagnóstico correto de animais sadios e vacinado após 12 meses.

#### **3.14.4. Teste de Reação em Cadeia de Polimerase - PCR**

O teste de PCR pode ser utilizado para diagnóstico direto, visto que neste teste é possível detectar fragmentos do DNA bacteriano nas amostras analisadas (PAULIN, 2003).

Romero et al. (1995) descreveram o teste de PCR como uma valiosa ferramenta para diagnóstico de brucelose, por apresentar alta sensibilidade e especificidade.

Guarino et al. (2000) referem que apesar da necessidade de um laboratório adequado para execução desta prova, a mesma é considerada simples, rápida, e de grande sensibilidade, que pode resultar em um controle preciso da brucelose em rebanhos bubalinos através da extração do DNA da bactéria no sangue total.

Munhoz (2012) relatou o uso do PCR no diagnóstico molecular como prova rápida para identificação da enfermidade, através da identificação *ante mortem* de *Brucella* sp. em sangue bovino, podendo ser diferenciado entre amostra vacinal ou de campo.

#### **3.15. CONTROLE E PROFILAXIA - VACINAS**

Em virtude da importância desta zoonose, diversos pesquisadores investem na busca da vacina ideal, aquela que produza imunidade e que não interfira no diagnóstico, varias vacinas já foram produzidas e outras continuam em estudo como as vacinas atenuadas, mortas, recombinantes, DNA, e as de subunidades, mas as vacinas mortas

não obtiveram a proteção almejada, sendo utilizadas nos programas atualmente as vacinas atenuadas e as demais continuam em pesquisa (QUINN et al. 2005; BRASIL, 2006; FLORES, 2007; FREITAS, 2012).

Atualmente em uso como profilaxia para a enfermidade se encontram disponíveis em território nacional as amostras de vacinas B19 e RB51, que são atenuadas e capazes de produzir a doença no homem. Sua utilização é preconizada pelo PNCEBT (FARIA, 2010).

Para Afazal et al. (2000) e Fosgate et al. (2003) estudos sobre o uso das vacinas B19 e RB51 em bubalinos ainda são reduzidos.

O monitoramento das vacinas produzidas no Brasil faz-se imperativo e necessário para garantir desta forma à qualidade das amostras vacinais utilizada na proteção dos animais (BRASIL, 2006). Neste sentido, Faria (2006) realizou estudo com as amostras vacinais produzidas por diversos laboratórios no Brasil, utilizando as amostras B19 e RB51, identificando alterações genéticas nas linhagens *B. abortus*, das duas vacinas. Após testes imunológicos, foi ressaltado que estas alterações genéticas não interferiram na proteção conferida pelas mesmas.

Poester, Gonçalves e Lage (2002) descreveram o Brasil como um país que possui laboratórios em condições de produzir vacinas com padrão de qualidade internacional e em grande escala, suprimindo a necessidade em território nacional no combate e controle da enfermidade.

Miranda (2009) em estudo sobre a avaliação de vacinas contra brucelose no Brasil comprovou as propriedades biológicas da vacina amostra B19 produzida em laboratórios nacionais que demonstram homogeneidade das vacinas elaboradas, e conclui que o Brasil possui condições de controlar a enfermidade.

As medidas de controle sanitário dos rebanhos como vacinação e diagnóstico de animais soropositivos para descarte do rebanho são medidas estratégicas para reduzir e/ou prevenir a brucelose (JARDIM et al. 2006).

Merecendo destaque no programa encontra-se o controle de trânsito de animais bovinos e bubalinos que ficou restrito e condicionado a apresentação de documentação que comprove exame negativo para brucelose e tuberculose, estes devem apresentar validade de apenas 60 dias (BRASIL, 2006).

Para Ferreira Neto (2009) as propriedades que realizam a prática da inseminação artificial (IA) sem controle sanitário correto devem evitar esta tecnologia, bem como o contato direto entre as propriedades.

O controle da brucelose deve estar baseado na vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas entre três e oito meses e em inquéritos sorológicos para identificar e eliminar os animais positivos dos rebanhos (BRASIL, 2006).

Ferreira Neto (2009) realizou levantamento da situação epidemiológica da brucelose no Brasil e verificou que a vacina B19 produzida e indicada pelo PNCEBT, possui eficácia e qualidade. Os programas de controle e erradicação da brucelose em bovinos e bubalinos em todos os países apoiam-se em vacinação em massa de bezerras com a estirpe B19 ou RB51 e na certificação de rebanhos livres (RIET-CORREA et al. 2007).

Del Fava et al. (2003) em estudo sobre manejo sanitário para prevenção de doenças da reprodução observaram que os animais submetidos ao manejo previsto e recomendado pelo PNCEBT que inclui a vacinação entre três e oito meses, não apresentam anticorpos aglutinantes acima de 24 meses, bem como o uso de medidas preventivas como o controle de trânsito de bovinos, controle da IA com sêmen livre de patógenos e o monitoramento semestral de enfermidades no rebanho, devem estar presentes em um programa sanitário em rebanho leiteiro para obtenção de sucesso na reprodução.

As empresas que produzem e comercializam as vacinas são fiscalizadas e monitoradas por instituições governamentais e visam à qualidade deste produto. Os profissionais médicos veterinários responsáveis pela aplicação destas no rebanho são técnicos treinados através de curso para obtenção de habilitação e depois o credenciamento, para que possam atuar neste controle. Empresas que comercializam vacinas são obrigadas a manter o serviço de defesa agropecuária das federações informadas sobre o fluxo de vacinas mensais, bem como os profissionais médicos veterinários devem produzir relatórios mensais sobre esta atividade (BRASIL, 2006).

### **3.15.1. Vacina B19**

A cepa virulenta da *B. abortus* B19 foi isolada em 1923 pela primeira vez, em uma vaca Jersey, e somente após 18 anos ou mais em temperatura ambiente a estirpe foi considerada não virulenta (Munir, 2009).

A vacina B19 é produzida a partir de uma amostra de *B. abortus* lisa, e utilizada para produção de vacinas desde a década de 30, do século passado. O seu uso para controle e erradicação da doença foi largamente empregado em vários países como:

Canadá, Dinamarca, Austrália, dentre outros. Por tratar-se de uma amostra lisa que produzem anticorpos, a mesma interfere diretamente em diagnósticos sorológicos, sendo a persistência destes diretamente ligada à idade do animal, não sendo indicado seu uso em fêmeas acima de oito meses (BRASIL, 2006).

Em testes sorológicos a vacina B19 pode produzir reações cruzadas com outras bactérias como *Salmonella urbana*, *Yersinia enterocolitica O:9*, *Pseudomonas maltophilia*, *Escherichia coli O157*, e outras (MEGID et al. 2000).

No PNCEBT a vacina oficial é a B19, sendo preconizada para uso nas fêmeas bovinas e bubalinas com faixa etária entre três a oito meses, sendo proibido seu uso em machos. Apresenta o inconveniente de ser produzida com cepa viva, sendo patogênica durante sua manipulação (BRASIL, 2006).

Poester et al. (2006b) descreveram a importância da vacina B19 por seu uso em diversos países, bem como a sua estabilidade patogênica, e eficiência imunológica e antigênica.

Munir (2009) relata a deficiência de estudos que comprovem a eficiência da vacina B19 em búfalos, visto que vários autores relatam a eficiência da vacina em bovinos protegendo-os de abortos entre 65% a 75%.

### **3.15.2. Vacina RB51**

A vacina RB51 é produzida com uma amostra de *B. abortus rugosa* atenuada, sendo a mesma originada de uma amostra lisa virulenta 2308, que sofreu diversas passagens em meio contendo frações de rifampicina. Devido tratar-se de uma amostra rugosa a mesma não induz a formação de anticorpos, conseqüentemente não interferem em diagnósticos sorológicos (Brasil, 2006).

A vacina RB51 através da IN nº 33, de 2007 encontra seu uso limitado no território brasileiro, a mesma somente deverá ser utilizadas em fêmeas bovinas, não sendo citado nesta IN, o uso para bubalinos, e somente acima de oito meses que não tenham sido vacinadas com a vacina B19, e que possuam sorologia negativa para *B. abortus* (BRASIL, 2009).

Munir (2009) realizou estudo sobre o uso da vacina RB51 em búfalos em diversas faixas etárias e concluiu que a proteção conferida por esta vacina contra abortos foi menor quando comparada ao grupo que utilizou a vacina B19.

A comercialização desta vacina encontra-se restrita a estabelecimentos comerciais registrados e autorizados. Sua comercialização deve ser realizada através de receituários constando o número de doses, local, data sendo devidamente assinados por médicos veterinários cadastrados na defesa. O estabelecimento deve reter os receituários e realizar relatórios mensais descrevendo compra, venda e estoque da mesma (BRASIL, 2009).

Poester (2006a) em estudo sobre a eficácia da vacina RB51 realizada em fêmeas bovinas acima de 380 dias, observou que a vacina RB51 além de induzir a imunidade aos animais vacinados também não interfere nos testes sorológicos.

Após estudo com o uso da vacina RB51 em novilhas prenhes que sofreram desafio com a cepa *B. abortus* com inoculação conjuntival, Poester et al. (2006b) inferiram que a vacina RB51 induziu imunidade protetora em fêmeas no início da gestação, e que apresentou vantagens, pois, não ocorreram abortos ou infecção, e nos testes sorológicos previstos no PNCEBT não houve interferências. Estes autores relatam a importância desta vacina para o programa do MAPA por poder ser utilizada em fêmeas não vacinadas com a cepa B19, ou seja, acima de oito meses.

Para Fosgate et al. (2003) o uso da vacina RB51 em bubalinos não demonstrou interferência para diagnóstico dos animais, mas também não apresentou eficácia quanto à prevenção em animais após exposição natural.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

O rebanho utilizado neste estudo é formado por animais mestiços do cruzamento entre as raças Murrah e Jafarabadi, foram selecionados 42 animais, distribuídos em dois grupos: o grupo teste constituído por 36 fêmeas bubalinas e o grupo controle formado por seis machos bubalinos. Para a seleção levou-se em consideração a faixa etária de três a oito meses de idade.

Os animais foram mantidos em manejo de pasto extensivo, junto com os demais animais do rebanho na região de várzea e terra firme, o rebanho do estudo possui manejo sanitário de vacinação contra febre aftosa e vermifugação duas vezes ao ano de acordo com a Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ).

Os animais do estudo receberam brincos com numeração de um a 36 para as fêmeas e de 39 a 44 para os machos. Nos dois grupos devido ao sistema extensivo os animais também receberam marcação a ferro quente no membro posterior esquerdo, para evitar a perda da parcela (Figura 2).



Figura 2. Marcação a ferro no membro posterior esquerdo para identificação dos animais do estudo.

### 4.2 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

Os animais procederam de uma propriedade do Município de Monte Alegre (Figura 3), pertencente à Mesorregião do Baixo Amazonas, Microrregião de Santarém, Estado do Pará, apresenta clima tipo Am, da classificação de Köppen, com média mensal de temperatura mínima superior a 18°C, estação seca de pouca duração, umidade elevada, amplitude térmica inferior a 5°C, e disponibilidade de água no solo (IDESP - ESTATÍSTICA MUNICIPAL, MONTE ALEGRE, PA, 2011).

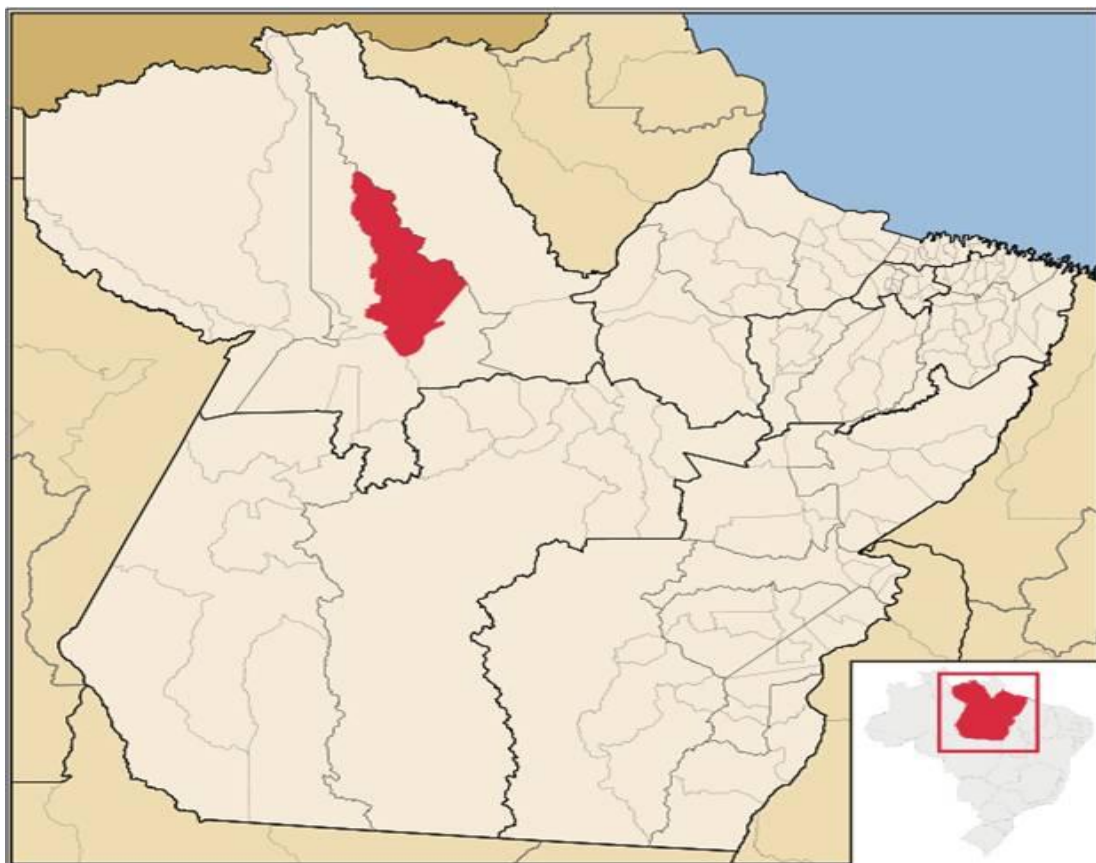


Figura 3. Localização de Monte Alegre no Estado do Pará. Fonte: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/45/Para\\_Municip\\_MonteAlegre.svg/620px-Para\\_Municip\\_MonteAlegre.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/45/Para_Municip_MonteAlegre.svg/620px-Para_Municip_MonteAlegre.svg.png)

A propriedade do experimento esta localizada as margens do Lago Jacarécapa, no ramal do Muruci no Município de Monte Alegre, na seguinte coordenada geográfica: DATUM: SAD69/ Hemisfério sul: fuso 21° - N (Registro na Agência de Defesa do Estado do Pará - ADEPARÁ).

#### 4.3 IMUNIZAÇÃO

No primeiro dia do estudo, foram coletadas amostras de sangue de todas as fêmeas e dos machos, em seguida as fêmeas receberam vacinas contra brucelose de

acordo com a orientação do fabricante (Vacina Anabortina Bovina B-19, Laboratório Meril<sup>®</sup>, Paulínia/SP, Brasil), na dose de 2,0mL por animal, via subcutânea da vacina Anabortina Bovina B-19, com o uso de seringa descartáveis de 3 mL, com agulhas 25 x 7mm. Após esse procedimento as bezerras foram marcadas a ferro quente no lado esquerdo da cara (Figura 4) com a letra V, acompanhada do algarismo final do ano da vacinação (V2), conforme orienta o PNCEBT do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).



Figura 4. Marcação a ferro na face esquerda após vacinação B19 e identificação dos animais com brincos

#### 4.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Para a avaliação da resposta imune humoral pós-vacinação para brucelose, foi realizada colheita de sangue na veia jugular de cada animal (momento zero) (Figura 5), utilizando-se seringas de 10 mL e agulhas 40 x 12 mm descartáveis sendo depois transferidos os sangues para tubos siliconizados de 10 ml. As amostras de sangue para análise foram centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos no Laboratório Multidisciplinar - I das Faculdades Integradas do Tapajós - FIT, em Santarém, Pará.

Após o processamento, o soro foi retirado e acondicionado em eppendorf com capacidade de 1 mL, e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos.



Figura 5. Coleta de sangue realizada na jugular de bezerra experimental, no dia 0(zero).

Durante o experimento realizou-se colheitas de sangue, respectivamente, nos dias 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 330, 360, e 390, sendo estas colheitas realizadas nas fêmeas e machos para análise dos anticorpos em todos os soros com as provas sorológicas: Antígeno Acidificado Tamponado - AAT, e 2 - Mercaptoetanol - 2-ME.

As colheitas não ocorreram no período dos 240, 270 e 300 dias em virtude da dificuldade de acesso aos animais, visto que os mesmos são submetidos a manejo extensivo na região de várzea onde de acordo com o nível das águas dos rios, algumas das ilhas foram se formando e os mesmos ficaram isolados.

#### 4.5. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de soro colhidas foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e depois foram transferidas e processadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Instituto da Saúde e Produção Animal - ISPA, da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, em Belém, Pará.

#### 4.6 TESTES SOROLÓGICOS

Os antígenos utilizados para a realização dos testes sorológicos foram adquiridos através da Agência de Defesa do Estado do Pará (ADEPARÁ) tendo os mesmos sido produzidos pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) e licenciados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para a seleção dos métodos sorológicos levou-se em consideração o custo, o tamanho das amostras e as características da população de estudo. A sensibilidade e a especificidade dos testes também foram consideradas de acordo com o PNCEBT (BRASIL, 2006). As provas selecionadas foram Antígeno Acidificado tamponado - AAT (Figura 6) e 2-Mercaptoetanol - 2-ME (Figura 7), classificadas como de triagem e confirmatória, respectivamente.

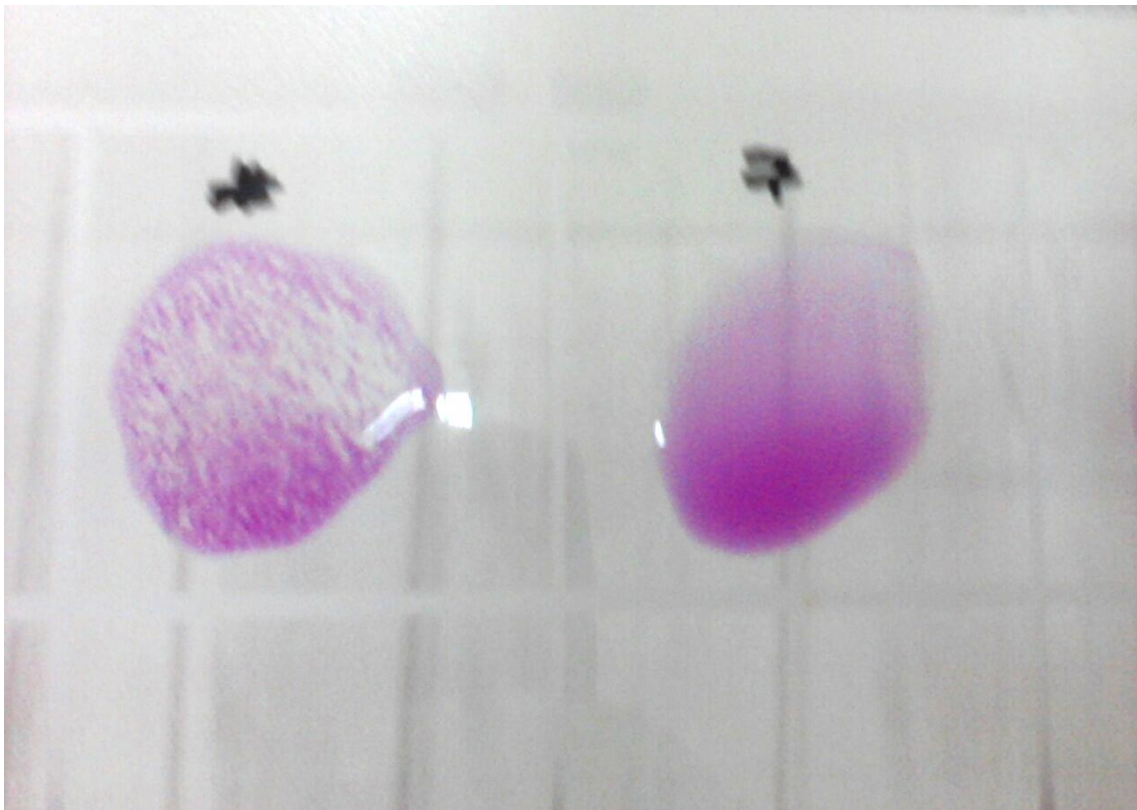


Figura 6. Amostra reagente e não reagente na prova de AAT.

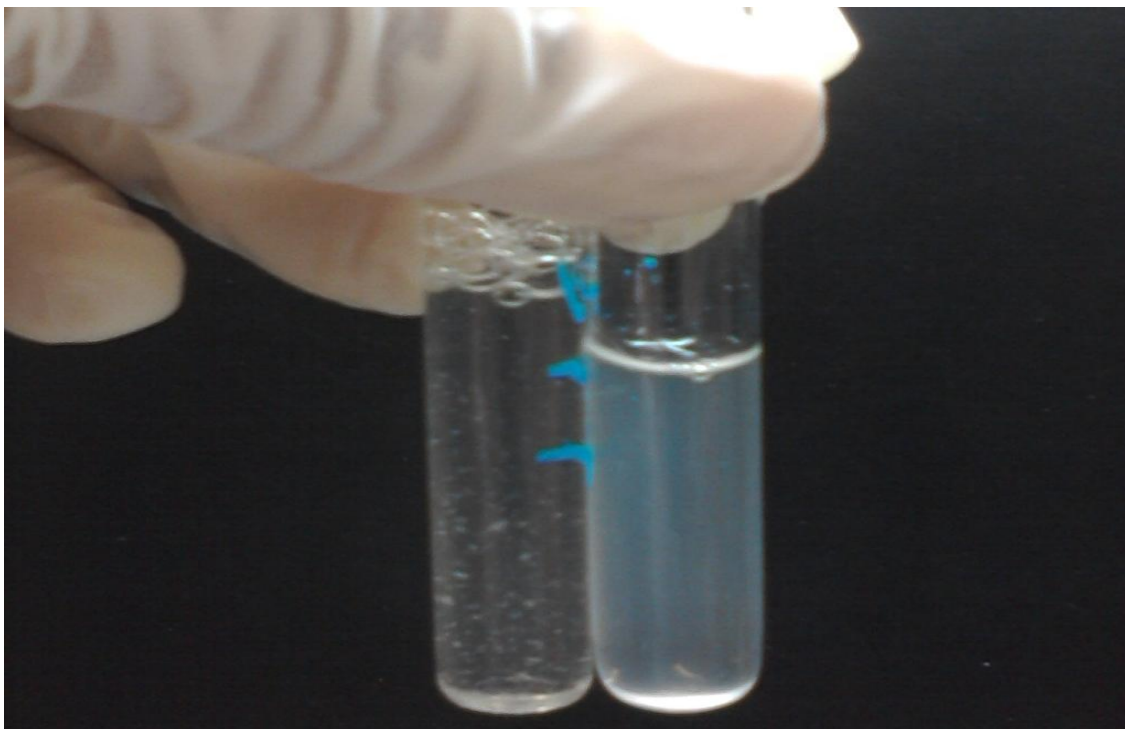


Figura 7. Tubos com amostra reagente e não reagente na prova 2-ME.

As provas foram realizadas e interpretadas de acordo com o Manual Técnico do PNCEBT (BRASIL, 2006) (Anexo B, Quadro 2 e 3).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram estabelecidos para os valores dos títulos médios utilizando-se a transformação logarítmica em escala  $\log_{10}$  dos títulos de anticorpos anti-*Brucella*. Para a análise das diferenças entre títulos de anticorpos e entre os grupos vacinais foi utilizada a análise de variância. Devido a análise de variância ter apresentado diferenças consideradas significativas, foi utilizado o pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos 1 e 2, em nível de significância ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

O acompanhamento dos animais do estudo teve início antes da vacinação com a cepa B19 de *B. abortus* sendo considerado como o dia zero, e seguiu-se até 390 dias após a vacinação (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 - Percentagem de fêmeas bubalinas reagentes nas provas AAT e 2-ME, após vacinação com cepa B19 de *Brucella abortus*.

Dias	AAT		2-ME	
	Reagente	%	Reagente	%
0	0	0	0	0
30	36	100	36	100
60	36	100	36	100
90	34	94	36	100
120	23	64	36	100
150	16	44	28	78
180	16	44	17	47
210	14	39	14	39
330	1	3	1	3
360	1	3	1	3
390	0	0	0	0

Tabela 2 - Amostras reagentes e não reagentes nas provas AAT e 2-ME de 36 fêmeas vacinadas com cepa B19 de *B. abortus*, do dia zero, aos 390 dias após a vacinação.

Dias	Sorologia	AAT	Sorologia	2-ME	Diluição			
	Reag.		Reag.		1:25	1:50	1:100	1:200
	F	%	F	%	F	F	F	F
0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	36	100	36	100	36	36	36	36
60	36	100	36	100	36	36	36	36
90	34	94	36	100	0	14	0	22
120	23	64	36	100	0	22	0	14
150	16	44	28	78	7	18	0	3
180	16	44	17	47	7	7	0	3
210	14	39	14	39	4	7	0	3
330	1	3	1	3	0	0	1	0
360	1	3	1	3	1	0	0	0
390	0	0	0	0	0	0	0	0

No dia zero todos os animais obtiveram resultado não reagente nos testes AAT e 2-ME ( $p > 0,05$  resultados não significativos).

Após **30 dias** da vacinação todas as fêmeas apresentaram pico máximo de reação, quando 100% das 36 fêmeas apresentaram-se reagente na prova AAT e na prova 2-ME. Os títulos obtidos foram de 200, e aos **60 dias** os animais mantiveram os resultados em todas as provas ( $p > 0,05$  resultados não significativos).

Aos **90 dias** após a vacinação, 6% das fêmeas foram não reagentes para prova AAT, no entanto, 100% destas mantiveram-se reagente na prova 2-ME, mas, iniciaram redução no título de 200, sendo que 60% apresentavam títulos de 200 e 40% com títulos de 50, mesmo assim, ainda todos os animais apresentavam reação com a diluição  $\geq 1:25$ , portanto ainda consideradas reagentes ( $p > 0,05$  resultados não significativos).

Aos **120 dias** após a vacinação, 36% das fêmeas se apresentaram não reagentes para prova AAT e na prova 2-ME 60% das fêmeas apresentavam títulos de 50 e 40% ainda mantinham as titulações de 200, mesmo assim, ainda apresentavam diluições  $\geq 1:25$  sendo consideradas reagentes ( $p < 0,05$  resultados significativos).



No decorrer de **150 dias** após a vacinação, 56% das fêmeas apresentaram-se não reagentes na prova AAT e para 2-ME 22% não foram reativas, mas 78% dos animais possuíam a seguinte titulação: 20% de 25, 50% de 50, e 8% de 200, estes animais ainda apresentavam diluição  $\geq 1:25$  e permaneceram reagentes ( $p < 0,05$  resultados significativos).

Na coleta aos **180 dias** os animais ainda reagentes para a prova ATT mantiveram-se, mas na prova 2-ME, 52% das fêmeas não possuíam mais títulos vacinais ( $p > 0,05$  resultados não significativos).

Aos **210 dias** os resultados obtidos para a prova AAT mostraram que 61% das fêmeas não eram reagentes e 61% não mais possuía títulos na prova 2-ME ( $p > 0,05$  resultado não significativo).

Aos **330 dias** apenas um animal se apresentou reagente para a prova AAT e para prova 2-ME com titulo de 100 ( $p > 0,05$  resultado não significativo) (Figura 8).

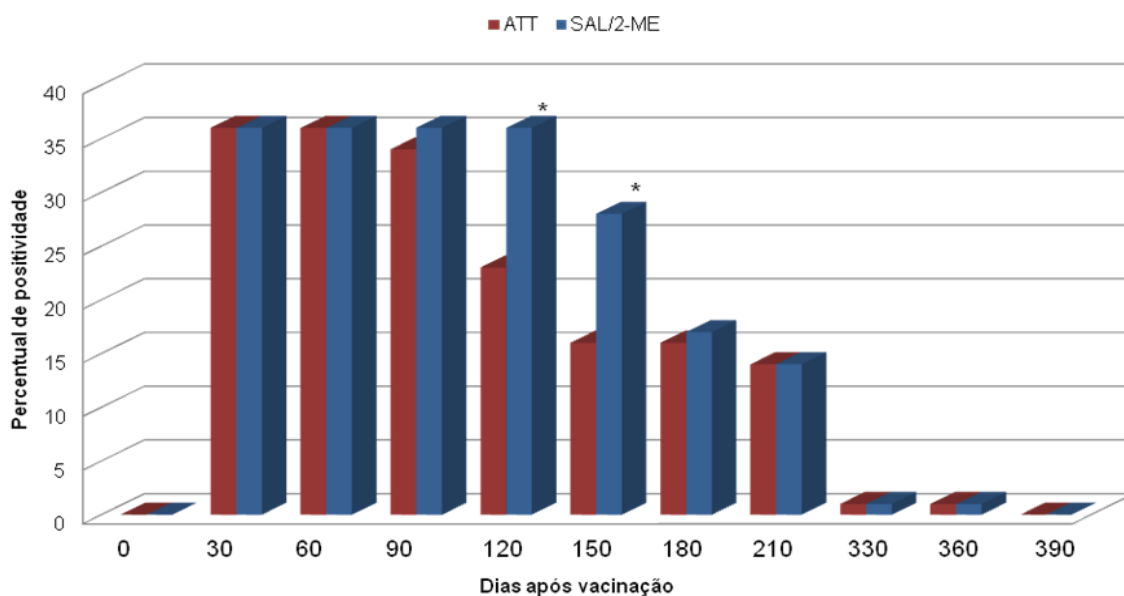


Figura 8: Percentual de animais reagentes nas provas de AAT e 2-ME após vacinação contra brucelose.  
\* diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

No nível dos **360 dias** do estudo um animal se manteve reagente na prova AAT e na prova 2-ME houve redução de títulos para 25, sendo ainda considerado reagente ( $p > 0,05$  resultado não significativo).

Somente aos **390 dias** todos os animais foram considerados não reagentes nas provas AAT e 2-ME com  $p > 0,05$  resultado não significativo.

Os machos (grupo controle) do estudo, não se apresentaram reagentes para as provas realizadas durante o período do estudo onde  $p > 0,05$  apresentando resultado não significativo.

Quando comparadas as provas, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e grupo teste nas provas AAT e 2-ME.

Em relação aos dias houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dias 30 e 60 quando comparados aos dias 330, 360 e 390.

## 6. DISCUSSÃO

Os testes realizados no soro sanguíneo das fêmeas (grupo teste) e dos machos (grupo controle) coletados antes da aplicação da vacina B19 resultaram em sorologia não reagente em todas as provas AAT e 2-ME, estes resultados são semelhantes aos encontrados em bubalinos por Poester e Reckziegel (1998) e Faria (2010).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o uso da vacina B19 em fêmeas bubalinas é eficiente visto que todas as fêmeas apresentaram resposta imunológica com títulos à reação da vacina conforme as provas sorológicas utilizadas: AAT e 2-ME. Este mesmo resultado foi obtido por Silva (2006) que avaliou fêmeas bubalinas na idade preconizada do PNCEBT/MAPA e obteve a confirmação na eficiência da vacinação após realizar as provas acima citadas e os animais apresentaram reação vacinal positiva. Após vacinação de bovinos contra brucelose utilizando amostra B19, Conceição et al. (2005) também comprovaram a eficácia da vacina, através da prova AAT, mas sugeriram o uso das provas 2-ME e FC como confirmatórias, por não apresentarem reações cruzadas e serem bastante específicas.

A resposta imune humoral ocorrida no presente estudo pode ser comprovada aos 30 dias após a vacinação com a amostra B19 de *B. abortus*, quando 100% dos animais apresentaram-se reagentes nas provas sorológicas, iniciando o declínio aos 90 dias nas provas AAT e 2-ME, corroborando com os resultados obtidos por Ribeiro et al. (1997) e Koloda (2005) em bovinos e Silva (2006) e Munir (2009) em bubalinos. Poester e Reckziegel (1998) avaliaram as vacinas B19 e RB51 em bubalinos e observaram também pico máximo na resposta de anticorpos ocorrida aos 30 dias para as duas vacinas e quanto ao período no início do declínio da reação antígeno-anticorpo aos 90 dias.

Munir (2009) relatou que a resposta imunológica em bubalinos de varias idades, foi mais acentuada em bezerras, e que o uso da vacina B19 em comparação a RB51, produziu 100% de resposta contra 77% somente com a vacina RB51.

Domingues et al. (1992) submeteu fêmeas bubalinas a vacinação em dose padrão e reduzida da amostra B19 obtendo também resposta na produção de anticorpos, tendo sido comprovada sua eficiência através de provas sorológicas. Afzal, Mirza e Jahangir (2000) avaliaram a resposta imune de fêmeas bubalinas em diferentes idades e com diferentes doses com a vacina para brucelose B19, e verificaram o sucesso da vacina em bezerras mais jovens, com dose completa, que apresentaram queda de títulos mais lenta.

Domingues et al. (1992) em estudo realizado em bezerras bubalinas tiveram a mesma conclusão quanto à adequada produção de anticorpos pós-vacina com dose padrão e reduzida, mas também observou a queda de títulos mais rápida com a dose reduzida. Os mesmos relatam não ter observado vantagens da meia dose sobre a dose total, mas demonstraram a vantagem da B19 em produzir redução de aborto, e como desvantagens a manutenção de altos títulos em animais adultos.

Jamal, Afzal e Ahmed (2003) monitoraram a resposta imune de bezerras bubalinas e cobaias a partir de vacina preparada com estirpe da vacina B19, os animais foram observados semanalmente e apresentaram resposta ao preparado, mas a queda de títulos nas bezerras desafiadas foi muito rápida, pois aos 91 dias não mais apresentaram títulos vacinais, a queda foi bastante precoce, vários fatores podem estar envolvidos neste fenômeno que podem ser intrínsecos ao preparo da vacina e/ou extrínsecos, esta precocidade permitiu aos autores questionar a proteção e eficácia da vacina preparada com a estirpe B19 sugerindo maiores estudos sobre o assunto.

Autores relatam o início da queda dos títulos vacinais aos 90 dias, tendo concordância com o presente estudo, estes avaliaram também em seus experimentos a sensibilidade e especificidade da prova AAT utilizada como triagem e obtiveram percentuais de 91,42 e 94,0 contra 95,3 e 91,8 respectivamente (MOLNÁR et al. 2002; PAULIN et al. 2006).

Os resultados obtidos com a prova AAT corresponderam aos critérios utilizados na seleção da prova sorológica, portanto apresentou baixo custo, facilidade na realização da prova, apresentando sensibilidade e especificidade nos resultados encontrados, para Megid et al. (2000) em seu experimento com bovinos descreve a prova AAT como eficiente para diagnóstico e controle da brucelose.

Observou-se concordância nos resultados entre a prova de triagem - AAT e a prova confirmatória 2-ME, que aos 90 dias apresentou animais não reagentes na prova AAT e o início do declínio nos títulos da prova 2-ME, o mesmo ocorreu de forma semelhante aos 210 dias após a vacinação quando 61% dos animais apresentavam-se não reagentes em todas as provas do experimento, resultados semelhantes foi obtido por Megid et al. (2000) que após avaliar as provas de soro aglutinação rápida, soro aglutinação lenta, AAT e 2-ME, para diagnóstico de brucelose em bovinos, concluíram que as provas AAT e 2-ME foram as que apresentaram maior coeficiente de concordância.

Almeida et al. (2010) referem que alguns autores encontraram altos índices de concordância entre as provas AAT e 2-ME, tendo sido observado 92,1% de anuência em seu experimento, reforçando a aquiescência entre estas provas, Ribeiro et al. (2003) também enfatiza os bons resultados destas provas. Contrário a estas afirmações Molnár et al. (2002) descrevem a prova AAT apresentando vários testes em bubalinos com resultados falso-negativo, o que causa preocupação, visto que, a mesma é indicada e aceita como prova para triagem em rebanhos bovinos e bubalinos.

Com relação à queda de títulos nas provas avaliadas no presente estudo, os resultados encontrados diferem quanto ao tempo obtidos por Silva, 2006, Poester e Reckziegel (1998), Domingues et al. (1992), Ribeiro et al. (2001) e Ribeiro et al. (1997) onde as fêmeas bubalinas vacinadas apresentavam-se reagentes até 180 dias (seis meses), 270 dias (nove meses), 240 dias (oito meses) e 300 dias (dez meses), respectivamente, visto que no presente estudo o tempo em que as fêmeas mantiveram-se reagentes após a vacinação foi de 360 dias (12 meses).

A justificativa de Poester e Reckziegel (1998) a esta reação duradoura foi à presença de animais no experimento acima da faixa etária de três a oito meses, o que difere do presente estudo, pois um animal manteve-se reagente por 12 meses, mas na data vacinação encontrava-se abaixo de oito meses, precisamente com quatro meses, quando levado em consideração idade máxima dos animais oito meses, todos os animais do estudo tinham no máximo 21 meses no final das coletas, estando todos dentro do prazo previsto pelo programa que seria de 24 meses para o re-teste dos animais vacinados.

Para Silva (2006) a precocidade na redução dos títulos vacinais em seu estudo estaria relacionada ao reduzido número dos animais, não sendo significativo para expressar a reação imune na espécie, outro detalhe é que estes animais habitavam a fazenda da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, no Estado do Pará, e os do presente estudo são oriundos de criações extensivas com maiores exposições aos desafios do meio.

Apesar disto não se pode afirmar que o tempo na queda dos títulos pós-vacinal em bubalinos seja maior que o de bovinos como descreveu Domingues et al. (1992) sendo necessária maior investigação sobre o comportamento da espécie bubalina submetida a vacinação conforme determina o PNCEBT, para que se possa inferir redução, manutenção e ou acréscimo de tempo para testar animais vacinados.

O declínio da titulação entre as provas AAT e 2-ME estiveram presentes em estudo feito em bovinos por Koloda (2005), com obtenção de resultados decrescentes, os bovinos se apresentaram não reagentes aos 300 dias para a prova 2-ME, considerada de boa especificidade, e aos 330 dias após a vacinação somente um animal permanecia reagente na prova AAT considerada uma prova de boa sensibilidade, com relação ao presente estudo um animal manteve-se reagente com titulação simultânea nas duas provas até os 360 dias, mas com titulação baixa.

Comparativamente, Poester e Reckziegel (1998), ao avaliar as provas AAT e 2-ME em seu experimento com bezerras bubalinas, descrevem a prova ATT que possui boa sensibilidade como justificativa para sua reação positiva por mais tempo, em nosso estudo as duas provas utilizadas mantiveram-se similares até 360 dias em apenas um animal.

Enfatizando a determinação do programa, Nardi Junior et al. (2012) realizaram advertência de somente ser testados animais acima de 24 meses após a vacinação contra brucelose, tendo como objetivo de evitar dificuldades na interpretação dos resultados nos exames aplicados devida as imunoglobulinas residuais de origem vacinal, que pode impedir a identificação de animais vacinados ou infectados. Estes autores relatam a escassez de estudos sorológicos realizados em fêmeas bubalinas para comprovar a eficiência da mesma de acordo com recomendações do PNCEBT.

Também Munir (2009) comprovou em estudo a queda precoce de títulos vacinais em bezerros bubalinos em comparação a novilhas e animais adultos, mas relata também que um pequeno grupo de animais bezerros e novilhas mantiveram seus títulos vacinais reagentes até 360 dias, com o uso da vacina B19, coincidindo com o que ocorreu no presente estudo onde apenas um animal manteve a titulação pós-vacina dentro desse período (12 meses).

Flores (2007) realizaram estudo sobre as vacinas utilizadas no Brasil para o manejo sanitário dos rebanhos e concluiu que a brucelose é a enfermidade mais monitorada nos rebanhos, em virtude da obrigatoriedade que o PNCEBT inferiu em território nacional, apresentando resultados positivos o programa.

A ideia aventada pelos autores Paulin e Ferreira Neto (2002), Del Fava et al. (2003) e Almeida et al. (2010) de que para o PNCEBT obter sucesso, o programa de imunização dos animais deverá ser amplo e acompanhado do manejo sanitário nas propriedades rurais, ressaltam também que a exposição constante dos animais aos

desafios do meio ambiente relacionado ao escore corporal baixo, não há como produzir boa resposta imunológica adequada através de vacinas.

Desta forma faz-se imperioso que os animais submetidos a programas de vacinação, recebam um manejo adequado com alimentação de qualidade para que o sistema imunológico dos mesmos possa imprimir a resposta adequada quando submetidos à vacinação.

Com relação às vacinas as pesquisas devem continuar para que se possa em um futuro, se possível breve, apresentar aos criadores uma vacina eficaz, com resposta imune prolongada, de fácil administração, baixo custo, sem efeitos colaterais, para que assim a economia nacional possa realmente ter o que comemorar no âmbito da produção animal.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho pôde-se concluir, com base nos resultados obtidos, que:

A resposta sorológica de bezerras bubalinas vacinadas entre três a oito meses pela vacina B19 contra a *Brucella abortus*, mostrou-se eficaz com reação positiva verificada através das provas AAT e 2-ME;

As provas utilizadas neste experimento e indicadas pelo PNCEBT foram eficientes na espécie bubalina, pois demonstraram as reações positivas e negativas ao longo de 390 dias;

O tempo previsto de 24 meses para o re-teste de fêmeas vacinas entre três a oito meses de acordo com o PNCEBT, foi confirmado neste experimento visto que se levado em consideração a idade limite de oito meses, ao final deste estudo todos os animais apresentavam idade máxima de 21 meses, portanto dentro do prazo previsto pelo programa;

A cobertura vacinal de bezerras bubalinas contra *B. abortus* com a amostra B19 apresentou-se eficiente, mas faz-se imprescindível buscar nesta espécie maiores esclarecimentos.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005. 580p.
- ABUBAKAR, M.; MANSOOR, M.; ARSHED, J.M. Bovine brucellosis: Old and new concepts with Pakistan perspective. **Pak. Vet. J.**, v.32, n.2, p.147-155, 2012.
- AFZAL, M.; MIRZA, M.A.; JAHANGIR, M. Immune response of buffaloes to vaccination with *Brucella abortus* strain 19. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.19, n.3, 2000.
- ALMEIDA, A.C. et al. Incidência de brucelose animal na região sul de Minas Gerais em rebanhos positivos ao teste do anel do leite: nota técnica. **Ciência Anim. Bras.**, Goiânia, v.11, n.4, p.966-970, out./dez, 2010.
- BARBOSA, N.G.S. Bubalinocultura no estado do Pará. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.29, n.1, p.34-38, 2005.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. Austin: Texas A & M University Press, College Station, 1994. v.2, p.1053-1066.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 2, de 10 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 jan. 2001. Seção 1, p.11-17.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)** / Brasília, MAPA/SDA/DSA, 2006.188p.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal – Brasília, MAPA/SDA/DSA, 440p, 2009.
- CAPORALE, V. et al. Efficacy of *Brucella abortus* vacinne strain RB51 compared to the reference vacina *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo. **Vet. Italiana**, v.46, p.13-19, 2010.
- CASTRO, H.A.; GONZÁLEZ, S.R.; PRAT, M.I. Brucellosis: una revisión práctica. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v.39, n.2, p.203-16, 2005.
- CASSIANO, L.A.P. et al. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.38, n.11, p.1337-1342, nov. 2003.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C.; et al. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia brasileira. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39, n.5, p.451-457, 2004.

CORRÊA, W.W.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed., Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1992. p.195-215.

CONCEIÇÃO, D.M. et al. Vacinação de bezerras entre 3 e 8 meses de idade, contra brucelose no Município de Santa Cruz da Conceição. **Ensaio e Ciência**, v.3, n.3, p.48-51, 2005.

DOMINGUES, P.F. et al. Pesquisas de aglutininas anti-*Brucella* sp. em soro de bezerras bubalinas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dose padrão ou reduzida da amostra B-19. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.44, n.6, p.491-9, dez, 1992.

DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.1, p.25-33, jan./mar., 2003.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E.M.; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: Experiência do Instituto biológico. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.73-79, 2007.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, n.40, p.193-194, 2002.

FAGIOLO, A. et al. Patologia de buffalo: In Borghese A. **Buffalo Production and Research**. Istituto Sperimentale per la ZOOTECCNIA, Roma, 2005, p.268- 271.

FARIA, A.P.P. **Análise em multilocus de repetições em TANDEM de numero variável (MLVA) de linhagens vacinais de B19 e RB 51 de *Brucella abortus***. 2010. 39f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília/DF, 2010.

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

FERREIRA NETO, J.S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções. **Ciência Anim. Bras., (Brazilian Anim. Science)**, out. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7669/5442>>. Acesso em: 30 Abr. 2012.

FIGUEIREDO, A.O. **Diagnóstico sorológico da brucelose bovina**. 2008. 26f. Monografia (Pós Graduação *Latu sensu* em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal) - Universidade Castelo Branco. Campo Grande/MS, 2008.

FLORES, E.F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. 890p.

- FOSGATE, G.T. et al. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Amer. J. of Vet. Research**, v.63, n.11, p.1473-1608, 2002.
- FOSGATE, G.T. et al. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine for domestic water buffalo (*bubalus bubalis*) in Trinidad. **Prev. Vet. Med.**, v. 58, p. 211-225, 2003.
- FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. **Intern. J. of System. and Evolut. Microb.**, v.57, p.2688-2693, 2007.
- FREITAS, J.A.; OLIVEIRA, J.P. Pesquisa de infecção brucélica em bovídeos abatidos portadores de bursite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.427-433, 2005.
- FREITAS, T.M.S. **Vacinas utilizadas no manejo sanitário de bovinos**. 2012. 38f. Seminário (Mestrado em Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012.
- GALINDO, R.C. et al. Diagnóstico sorológico de brucelose em bovinos de leite, criados na microrregião agreste de Itabaiana. In: **X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX**, 2010 - UFRPE: Recife.
- GIDLEWSKI, T. et al. Experimental *Brucella abortus* induced abortion in a llama: pathologic effects. **Vet. Pathol.**, v.37, p.77-82, 2000.
- GUARINO, A. et al. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. **The Vet. Rec.**, v.25, n.11, p.634-636, 2000.
- 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. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.22, n.3, p.893-897, 2003.
- JARDIM, G.C. **Avaliação comparativa das técnicas de ELISA indireto, antígeno acidificado tamponado, 2-mercaptoetanol com soroaglutinação lenta e fixação de complemento para o diagnóstico da brucelose em rebanho bovino não vacinado, rebanho vacinado com dose padrão e rebanho vacinado com dose reduzida da amostra 19 de *Brucella abortus***. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista-UNESP, 2003.
- JARDIM, G.C. et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n.3, p.177-182, 2006.
- JORGE, A.M. Produção de carne bubalina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.84-95, abril/jun., 2005.
- KOLODA, M. **Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* (Frederick Bang, 1897)**. 2005, 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LAGE, A.P. et al. Brucelose bovina: uma atualização. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.202-212, jul./set., 2008.

LEITE, R.C.; BASTIANETTO, E. Doenças infecciosas em búfalos. **Ciência Anim. Bras.**, 1, out. 2009. Disponível em:<<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7665/5438>>. Acesso em: 30 Abr. 2012.

LAWINSKY, M.L.J. et al. Estado da arte da brucelose em humanos. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, v.1, n. 4, p.75-84, 2010.

LOURENÇO JUNIOR, J.B.; GARCIA, A.R. Panorama da bubalinocultura na Amazônia. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA - AMAZONPEC, 1, 2008, Belém. **Anais...** Belém-PA, 2008 (Palestra; CD-ROM).

MARIANTE, A.S. et al. Conservação de raças brasileiras ameaçadas de extinção e a importância de sua inserção em sistemas de produção. **Agrociência**, n.3, p.459-464, 2005.

MARQUES, J.R.F. et al. A Bubalinocultura no Brasil: criação, melhoramento e perspectivas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 16., 2006, Recife-PE. **Palestras...** Recife: (CD-ROM). ZOOTEC, 2006.

MEGID, J. et al. Avaliação das provas de soroglutinação rápida, soroglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.37, n.5, 2000.

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

MEIRELLES-BARTOLI, R.B.; MATHIAS, L.A. Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.11-17, jan./mar., 2010.

MENDES, M. B. et al. Determinação da Prevalência das Principais Doenças da Reprodução no Rebanho Bovino da Região de Uberaba-MG. **Ciência Anim. Bras.**, v. 1, p. 772-777, 2009.

MINERVINO, A.H.H.; CARDOSO, E.C.; ORTOLANI, E.L. Características do sistema produtivo da pecuária no município de Santarém, Pará. **Acta Amaz.**, v.38, n.1, p. 11-16, 2008.

MINERVINO, A.H.H. et al. Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no estado do Pará. **Acta Vet. Bras.**, v.5, n.1, p.47-53, 2011.

MINHARRO, S. et al. Biovariedades de *Brucella abortus* isoladas de bovinos no Brasil. **Ciência Anim. Bras.**, 1, out. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7817/5621>>. Acesso em: 30 Abr. 2012.

- MIRANDA, K.L. **Evaluation of brucellosis vaccines in Brazil.** (Avaliação de vacinas contra brucelose bovina no Brasil). 2009. 77f. Tese (Doutora em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2009.
- MOLNÁR, L. et al. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, n.2, p.41-44, 2002.
- MONTEIRO, L.A.R.C. **Prevalência e fatores de risco associados á Brucelose Bovina em Rebanhos de Mato Grosso do Sul.** 2004. 31f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.
- MOTA, A.L.A.A. **Fatores de risco para brucelose bovina no Brasil.** 2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, 2011.
- MUNHOZ, A.L.R. **Diagnóstico molecular ante mortem de *Brucella* spp. em bovinos.** 2012. 47f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande/MS, 2012.
- MUNIR, R. **Immune response of buffaloes against *brucella abortus* vaccines.** 2009. 163f. Thesis (Doctor of Philosophy in Biochemistry Department). Faculty of Sciences. Pir Mehr Ali Shah. Arid Agriculture University Rawalpindi. Pakistan, 2009.
- NARDI JUNIOR, G. et al. Brucelose em bubalinos: uma revisão com ênfase ao soro diagnóstico oficial. **Vet. e Zootec.**, v.19, n.2, p.142-156, jun. 2012.
- NASCIMENTO, M.V. et al. Aspectos epidemiológicos da *Brucella abortus*. **Rev. Cient. Elet. de Med. Vet.** Semestral, ed.4, jan. 2005.
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Organización Mundial de Sanidad Animal. **Código Zoonosanitario Internacional.** Mamíferos, aves y abejas. Novena edición. Paris - França: OIE, 2000, 489p.
- PAULIN, L.M.S; FERREIRA NETO, J.S. A experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.2, p.105-112, abr./jun., 2002.
- PAULIN, L.M.S. et al. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.4, p.41-47, 2002.
- PAULIN L.M.S; FERREIRA NETO, J.S. O combate à brucelose bovina: Situação brasileira. **Funep**, Jaboticabal, p.154, 2003.
- PAULIN, L.M.S. Brucelose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, 2003.
- PAULIN, L.M.S. et al. Estudo comparativo de quatro técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Biológico**, São Paulo, v.68, Suplemento, p.118-122, 2006.

PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. Brucelose em búfalos **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.3, p.389-401, jul./set., 2008.

PINTO, M.R.A. et al. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação de complemento e 2-mercaptoetanol, para diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. **Ars Vet.**, Jaboticabal, SP, v.21, Suplemento, p.147-154, 2005.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose - uma revisão sistematizada. **Med. Int.**, v.10, n.2, p.91-100, 2003.

POESTER, F.P.; RECKZIEGEL, P.E. Persistência de reações sorológicas em búfalas (*bubalus bubalis*) vacinadas com *Brucella abortus* amostra 19. **Pesq. Agrop. Gaúcha**, v.4, n.1, p.39-41, 1998.

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

POESTER, F.P. **Eficácia da vacina RB 51 em novinhas**. 2006. 52f. Tese (Doutor em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2006a.

POESTER, F.P. et al. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, v.24, p.5327-5334, 2006b.

POESTER, F.P. et al. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl. 1, p.1-5, 2009.

PELLEGRIN, A.O. et al. **Coleta de material para diagnóstico das doenças infecciosas que interferem com a reprodução de bovinos**. Corumbá/MS. Embrapa, 2003. p.1-3 (Circular Técnica, n.45).

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2005, 512.p.

RAMOS, J.B. **O problema da pecuária na Amazônia**. Publicada no Informativo do Instituto Ecológico Aqualung - IEA n. 85 (maio/junho 2009). Disponível em: <http://www.institutoaqualung.com.br/info%2085.pdf>. Acesso: 08 agosto 2013.

RAMOS, T.R.R. et al. Prevalência de anticorpos anti *Brucella abortus* e estudo de fatores de risco para brucelose bovina em rebanhos leiteiros na microrregião de Araguaína-Tocantins. **Vet. e Zootec.**, v.17, n.4, p.577- 584, 2010.

RHYAN, J.C. et al. Seminal vesiculitis and orchitis caused by *Brucella abortus* biovar 1 in young bison bulls from South Dakota. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.9, p.368-374, 1997. Downloaded from [vdi.sagepub.com](http://vdi.sagepub.com) at Univ. Federal do Pará on August 22, 2012.

RIBEIRO, M.G. et al. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.49, n.2, p.137-150, 1997.

RIBEIRO, A.R.P. et al. Prevalência de tuberculose e brucelose bovina no município de Ilhéus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.55, n. 1, Feb. 2003. . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352003000100021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000100021&lng=en&nrm=iso)>. access on 03 Aug. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000100021>.

RIBEIRO, M.G. et al. Perfil de aglutininas anti- *Brucella abortus* em provas de triagem e confirmatórias, em bezerras búfalas vacinadas com a B19. In: 28º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA; 2001, Salvador-BA. **Anais...** Salvador: SBMV, 2001. p160.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3ª Edição, v.1, Santa Maria: Pallotti, 2007.

ROMERO, C. et al. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. **J. of Clin. Microb.**, Mar. 1995, p.615–617. Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on August 21, 2012.

ROSA, B.R.T. et al. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. **Rev. Cient. Eletrô. Med. Vet.**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/Famed. Ano iv, n.8, 2007.

SAMARA, S.I.; BUZINARO, M.G.; CARVALHO, A.A.B. Implicações técnicas da vacinação na resposta imune contra o vírus da febre aftosa. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.41, n.6, p.375-378, 2004.

SANTOS, W.R.R. **Investigação soroepidemiológica para brucelose e leptospirose em equídeos de tração e seus tratadores nos municípios de Belém e Ananindeua - Pará Belém**. 2007. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Agrárias; Universidade Federal Rural da Amazônia; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental, Belém, 2007.

SILVA, J.V. et al. Brucelose, Leptospirose e Tuberculose em caititu (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001. Salvador-BA. **Resumos...** Salvador, 2001.p.12-13.

SILVA, S.P. **Avaliação dos títulos de anticorpos anti-brucella abortus em bezerras búfalas (*bubalus bubalis*) vacinadas com amostra B19**. 2006, 43f. Monografia (Bacharel em Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-Pará, 2006.

SILVA, V.G.S.O. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl. 1, p.109-117, 2009.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E. et al. A novel *Brucella* isolated in association with two cases of stillbirth in nonhuman primates - first report. **J. Med. Primatol.**, v.38, p.70-73, 2009.

SMITH, H.L.; KADRI, S.M. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. **Indian J. Med. Res.** v.122, p.375-384, 2005.

SOUSA, C.L. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na ilha do Marajó - PA. **B. CEPPA**, Curitiba, v.20, n.2, p.191-202, 2002.

SOUZA, V.P.; SOARES, C.O.; FERREIRA, S.F. **Vacinação, a importância das boas práticas e a prevenção de doenças de interesse na bovinocultura.** Campo Grande - MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. p.1-15. (Comunicado Técnico n.122).

TILLER, R.V. et al. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year old patient with chronic destructive pneumonia. **BMC Microbiol.**, v.10, p.23, 2010.

XAVIER, M.N. et al. Pathological, Immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **J. Comp. Path.**, v.140, p.149-157, 2009.

XAVIER, M.N. et al. Pathogenesis of *Brucella* spp. **The Open Vet. Science J.**, v.4, p.109-118, 2010.

YANG, X. et al. Progress in *Brucella* vaccine development. **Front Biol.**, Beijing, v.8, n.1, p. 60-77, 2013.



**ANEXOS**

## ANEXO A – Prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

### TÉCNICA DA PROVA DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)

#### Material:

- ✓ Antígeno para AAT
- ✓ Soro a Testar
- ✓ Placa de vidro
- ✓ Pipetas de Bang
- ✓ Micropipetador de 30 $\mu$ l ou de volume ajustável
- ✓ Ponteiros
- ✓ Placa com quadrados de 4 cm delimitados
- ✓ Misturador de plástico
- ✓ Caixa de luz indireta

#### Técnica:

Os soros a ser testado e os antígenos devem estar com temperatura ambiente, pelo menos 30 minutos de antecedência.

Os soros devem ser homogeneizados antes do início da prova.

Identificar à localização de cada soro, com um pipetador de 30 $\mu$ l, dispensar 30 $\mu$ l de soro na placa de vidro, encostando a pipeta na placa formando um ângulo de 45°.

Após agitar de forma suave o antígeno colocar 30 $\mu$ l do antígeno ao lado do soro na placa de vidro sem misturar os dois.

Com o uso de um misturador de plástico realizar a homogeneização do antígeno com o soro em movimentos circulares até obter um círculo em torno de 2 cm.

A placa de vidro deverá receber movimentos oscilatórios com frequência aproximada de 30 movimentos por minuto, durante 4 minutos.

Passados os 4 minutos proceder à leitura realizada em caixa de luz indireta, obedecendo à orientação de desprezar as reações que ocorram após 4 minutos.

A interpretação dos resultados ocorrerá de acordo com a legenda abaixo:

Presença de grumos - **REAGENTE**

Ausência de grumos - **NÃO REAGENTE**

**ANEXO B – Prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME)****TÉCNICA DA PROVA DO 2-MERCAPTOETANOL****Material:**

- ✓ Antígeno para soro aglutinação lenta em tubos
- ✓ 2-Mercaptoetanol
- ✓ Solução salina 0,85%
- ✓ Solução salina 0,85%, fenicada a 0,5%
- ✓ Amostras do soro para testar
- ✓ Tubos de 10 mm x 75 mm ou 10 mm x 100 mm
- ✓ Pipetas de Bang de volume ajustável
- ✓ Pipetas de 10 ml
- ✓ Dispensador automático de 1 ml e 2 ml
- ✓ Grade para os tubos
- ✓ Caixa de luz indireta
- ✓ Estufa á 37°C
- ✓ Vidrarias para as diluições

**Técnica:**

Colocar na estante 2 fileiras com 4 tubos 10 mm x 75 mm ou 10 mm x 100 mm, os frascos da primeira fileira deverão receber identificação com a letra T de soro aglutinação lenta em tubos, e os frascos da segunda fileira deverão receber a identificação com a letra M de 2-ME.

Com o uso de pipeta de bang de volume ajustável, colocar nos tubos da primeira fila o soro a ser testado na seguinte sequência de volume de 0,08ml, 0,04ml, 0,02ml, 0,01ml o mesmo procedimento deverá ser realizado na segunda fila de tubos (fila T e fila M - identificação).

Na fileira identificada com a letra “T”, utilizando um dispensador automático de 2 ml, adicionar 2 ml de antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em solução salina fenicada com 0,5% de fenol.

Na fileira identificada com a letra “M”, utilizando um dispensador automático de 2 ml, adicionar 1 ml de solução de 2-ME a 0,1M, diluída em solução salina sem fenol.

Misturar agitando a estante.

Após repouso das amostras por 30 minutos em temperatura ambiente, utilizar outro dispensador automático, para adicionar em cada tubo da fileira “M” 1 ml de antígeno diluído 1:50 (0,09% de células) em solução salina fisiológica sem fenol. A concentração final do antígeno na solução será de 0,045%.

Homogeneizar novamente agitando a estante. As estantes devem ser incubadas a 37° C por 48 horas.

A leitura dos tubos deverá ser realizada com o uso de uma fonte de luz indireta que atravessa os tubos e contra um fundo escuro e opaco.

### **Interpretação dos resultados:**

Deverá ser realizada de acordo com orientação do PNCEBT, que leva em consideração o grau de aglutinação ocorrida em cada uma das diluições, sendo classificadas como:

Completo (+), Incompleto (I), ou Negativo (-).

**Reação completa (+)** apresenta o líquido da mistura antígeno - anticorpo translúcido, e quando sob suave agitação os grumos não rompem.

**Reação Incompleta (I)** apresenta o líquido da mistura antígeno - anticorpo parcialmente translúcido, e quando sob suave agitação os grumos não rompem.

**Reação Negativa (-)** apresenta o líquido da mistura antígeno - anticorpo opaco ou turvo, quando sob suave agitação não revela grumos.

A interpretação das provas deverá ser realizada de acordo com os Quadros 2 e 3 abaixo.

**Quadro 2:** Interpretação da prova 2-ME, para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, vacinadas entre 3 e 8 meses.

SAL/2-ME	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25I	-	-							
25	-	-	+						
50I	-	-	+	+					
50	-	-	+	+	+				
100I	-	-	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: PNCEBT/MAPA (2006)

**Legenda:**

+: Positivo

-: Negativo

Inc: Reação Inconclusiva

Cinza: Combinação que não pode ocorrer

2-ME: 2 Mercaptoetanol

SAL: Soro aglutinação lenta

NR: Não reagente

I: Reação incompleta

**Quadro 3:** Interpretação da prova 2-ME, para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a 8 meses.

SAL/ME	NR	25I	25	50I	50	100I	100	200I	200
NR	-								
25I	-	-							
25	-	-	+						
50I	-	-	+	+					
50	Inc	Inc	+	+	+				
100I	Inc	Inc	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: PNCEBT/MAPA (2006)

**Legenda:**

+: Positivo

-: Negativo

Inc: Reação Inconclusiva

Cinza: Combinação que não pode ocorrer

2-ME: 2 Mercaptoetanol

SAL: Soroaglutinação lenta

NR: Não reagente

I: Reação incompleta.