

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA NOS  
TRÓPICOS

**ALESSANDRO JOSÉ FERREIRA DOS SANTOS**

**SOROCONVERSÃO ATRIBUÍVEL À VACINAÇÃO DE BEZERRAS COM A CEPA B-19 DE  
*Brucella abortus***

Araguaína/TO

2017

ALESSANDRO JOSÉ FERREIRA DOS SANTOS

**SOROCONVERSÃO ATRIBUÍVEL À VACINAÇÃO DE BEZERRAS COM A CEPA B-19 DE  
*Brucella abortus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt), da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae* em sanidade animal e saúde pública nos trópicos.

**Orientadora Profa. Dra.**

Katyane de Sousa Almeida

**Co-orientador Prof. Dr.**

Francisco Baptista

ARAGUAÍNA/TO

2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

S237s Santos, Alessandro José Ferreira dos.  
Soroconversão atribuível à vacinação de bezerras com a cepa B-19 de *Brucella abortus*. / Alessandro José Ferreira dos Santos. – Araguaína, TO, 2017.  
57 f.  
  
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2017.  
Orientadora : Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida  
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Baptista  
  
1. Brucelose. 2. Diagnóstico. 3. Monitoramento. 4. Vacinação. I.  
Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

ALESSANDRO JOSÉ FERREIRA DOS SANTOS

**SOROCONVERSÃO ATRIBUÍVEL À VACINAÇÃO DE BEZERRAS COM A CEPA B-19 DE  
*Brucella abortus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt), da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae* em sanidade animal e saúde pública nos trópicos.

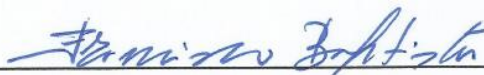
Orientadora: Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida  
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Baptista

Aprovado em: 25 / 08 / 2017.

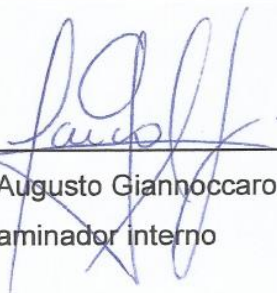
Banca Examinadora



Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida  
Orientadora



Prof. Dr. Francisco Baptista  
Examinador externo



Prof. Dr. Marco Augusto Giannoccaro da Silva  
Examinador interno

*Dedico este trabalho à minha mãe, Iracema, pelos exemplos de retidão e ensinamentos de respeito ao próximo. À minha esposa, Ronilda Tavares, pelo carinho e amor dedicado. E aos meus filhos, Aleksander e Maria Júlia, que são fortes incentivos para que eu, humildemente, possa continuar vencendo os desafios da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar.

À minha irmã, Cássia, pelo seu exemplo de batalha e luta para conquistar algo tão sonhado. Ao meu querido sobrinho, Wallife, que muitas vezes sem entender o que estava acontecendo, com um simples sorriso bastava para nos animar.

À família da minha esposa, especialmente ao Sr. Françóis e D. Francisca, por estarem sempre me incentivando durante essa jornada.

Aos meus pastores Gilson Martins e Dayenne Cruz, bem como a Irmã Zuleide Gonçalves e demais irmãos da Igreja Pentecostal Ministério Semeando Bênçãos, pelas orações em prol do meu sucesso durante essa fase especial da minha vida.

À Profa. Dra. Katyane de Sousa Almeida e ao Prof. Dr. Francisco Baptista, pela orientação, amizade e credibilidade em mim depositada. Eles não me orientaram apenas neste trabalho, pelas experiências pessoais e profissionais, considero-os também como meus orientadores para vida. A eles devo parte do meu conhecimento e experiência acumulados durante esse processo de formação profissional.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins pelos ensinamentos e apoio sempre que necessário.

A todos os meus amigos da Agência de Defesa Agropecuária do Tocantins aqui representados pelo Dr. Jardel Martins Ferreira, um grande irmão, que prestou uma colaboração inestimável na execução dos trabalhos de campo, laboratorial e estatístico desta pesquisa.

Ao Dr. José Wilson, do Laboratório Veterinário Guilherme Dourado, por ter disponibilizado os antígenos utilizados nas análises laboratoriais deste projeto.

Aos produtores rurais que colaboraram voluntariamente disponibilizando suas bezerras em idade vacinal para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos da 1ª Turma do Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) com quem tive o enorme prazer e satisfação de conviver durante dois anos na Universidade Federal do Tocantins. São eles: Fabiana Chagas, Helane Dias, Isaura Maria, Juliana Moraes, Maria Cirlene e Osmar Negreiros. Que Deus abençoe as suas vidas em todos os seus desafios.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília e à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, instituições pelas quais tenho enorme admiração e carinho. A elas devo minha formação acadêmica.

A todas as pessoas que trilharam comigo nesse longo caminho.

*O meu sincero obrigado!*

*"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A brucelose bovina é uma antropozoonose cosmopolita, causada por *B. abortus*, que gera perdas econômicas para a cadeia produtiva de carne e leite. Com o objetivo de determinar o coeficiente de soroconversão atribuível à vacinação de bezerras com a cepa B-19 de *B. abortus*, foram analisadas 330 amostras de soro sanguíneo de 110 bezerras com três a oito meses de idade provenientes de cinco propriedades no município de Araguaína/TO. Foi realizado um ensaio randomizado com dois grupos de bezerras, intervenção e controle, cada um com 55 animais. O dia zero (D-0) do experimento foi marcado a partir da primeira coleta de sangue imediatamente antes da vacinação das bezerras do grupo intervenção. As coletas de sangue pós-vacinação foram realizadas nos dias 7 (D-7), 14 (D-14) e 21 (D-21). O ensaio randomizado foi realizado até o D-14, quando as bezerras do grupo controle foram vacinadas com cepa B-19. A coleta de 55 amostras de sangue no D-21 permitiu repetir, com o grupo controle, a determinação da soroconversão no sétimo dia pós-vacinação. Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste do AAT. As análises estatísticas foram realizadas com o software WinPepi<sup>®</sup> (versão 11.43) e o coeficiente de soroconversão atribuível à vacinação foi calculado subtraindo-se da incidência de soroconversão no grupo intervenção àquela do grupo controle. No D-7 a soroconversão no grupo intervenção foi de 94,55% (IC 95% [84,88% a 98,84%]) e no grupo controle foi nula (IC 95% [0,00% a 6,49%]). No D-14 a soroconversão no grupo controle continuou sendo nula e a do grupo intervenção foi de 98,18% (IC 95% [90,28% a 99,95%]). Assim, a soroconversão atribuível à vacinação pode variar entre 78,39% (84,88% - 6,49%) e 92,37% (98,86% - 6,49%), e entre 84,21% (90,28% - 6,49%) e 99,46% (99,95% - 6,49%) no D-7 e D-14, respectivamente. No D-21 a soroconversão nas 55 bezerras utilizadas no grupo controle vacinadas no D-14 foi de 100% (IC 95% [93,51% a 100%]), mas sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à resposta no D-7 do grupo intervenção. Visando monitorar a vacinação, a FAO recomenda que sejam realizados testes de diagnóstico utilizando o AAT em duas a três semanas pós-vacinação em amostragens aleatórias de bezerras vacinadas com a cepa B-19, tendo como parâmetro uma soroconversão de 80%. Os resultados deste estudo permitem recomendar ao SVO que institua auditoria da vacinação, com coleta aleatória de amostras de sangue a partir do sétimo dia em bezerras declaradas como vacinadas com a cepa B-19, utilizando a prova do AAT como teste de diagnóstico e considerando um coeficiente mínimo de soroconversão de 75%, visando o monitoramento do processo de vacinação realizado sob responsabilidade técnica de médicos veterinários cadastrados nos Programas Estaduais de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.

**Palavras-chave:** Brucelose; diagnóstico; monitoramento; PNCEBT; vacinação.



## ABSTRACT

Bovine brucellosis is a cosmopolitan anthroponosis caused by *B. abortus*, which causes economic losses to the meat and milk production chain. In order to determine the seroconversion coefficient attributable to the vaccination of heifers with *B. abortus* strain B-19, 330 blood serum samples from 110 heifers with three to eight months of age were analyzed from five properties in the municipality of Araguaína/TO. A randomized trial was carried out with two groups of heifers, intervention and control, each with 55 animals. Day zero (D-0) of the experiment was marked from the first blood collection immediately before vaccination of intervention group heifers. Post-vaccination blood samples were collected on days 7 (D-7), 14 (D-14) and 21 (D-21). The randomized trial was conducted until D-14, when the heifers of the control group were vaccinated with strain B-19. The collection of 55 blood samples in D-21 allowed to repeat the determination of seroconversion on the seventh day post-vaccination with the control group. All serum samples were submitted to the AAT test. Statistical analyzes were performed with WinPepi® software (version 11.43) and the seroconversion coefficient attributable to vaccination was calculated by subtracting the incidence of seroconversion in the intervention group from that of the control group. In D-7 the seroconversion in the intervention group was 94.55% (95% CI [84.88% to 98.86%]) and in the control group it was null (95% CI [0.00% to 6.49 %]). In D-14 the seroconversion in the control group remained null and that of the intervention group was 98.18% (95% CI [90.28% to 99.95%]). In D-21 the seroconversion in the 55 heifers used in the control group vaccinated in D-14 was 100% (95% CI [93.51% to 100%]), but without significant difference ( $p \leq 0.05$ ) to the D-7 response of the intervention group. In order to monitor vaccination, FAO recommends that diagnostic tests be performed using AAT within 2 to 3 weeks post-vaccination on random sampling of heifers vaccinated with strain B-19, with 80% seroconversion as the parameter. The results of this study allow us to recommend to the SVO that we institute a vaccination audit, with random collection of blood samples from the seventh day on calves declared as vaccinated with strain B-19, using the AAT test as a diagnostic test and considering a minimum coefficient of seroconversion of 75%, aiming at the monitoring of the vaccination process carried out under the technical responsibility of veterinarians enrolled in the State Programs for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis.

**Keywords:** Brucellosis; diagnosis; monitoring; NPCEBT; vaccination.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 - Estudo de prevalência da brucelose realizado no Brasil entre os anos de 1998 e 2004 .....	10
Figura 2 - Estudo de prevalência da brucelose realizado no Brasil entre os anos de 2009 e 2014 .....	10
Figura 3 - Coeficiente de cobertura vacinal nos últimos 13 anos no estado do Tocantins e prevalência da brucelose bovina em fêmeas (>24 meses) na microrregião de Araguaína/TO .....	23
Figura 4 - Coeficiente de cobertura vacinal nos últimos 13 anos no estado do Tocantins e prevalência de focos da brucelose bovina na microrregião de Araguaína/TO.....	23

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Prevalência da brucelose bovina no Brasil.....	9
Tabela 2 - Comparação entre o primeiro e segundo estudo da prevalência da brucelose bovina em rebanhos em estados brasileiros, com intervalo de aproximadamente 10 anos.....	9
Tabela 3 - Número de bezerras reagentes ao teste de diagnóstico do AAT no D-0, D-7, D-14 e D-21, Tocantins, 2017 .....	32
Tabela 4 - Prevalência de focos da brucelose bovina no estado do Tocantins, 2017.....	33

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Distribuição de laboratórios credenciados pelo MAPA e oficiais no Brasil.....	19
Quadro 2 - Classificação de risco para brucelose bovina e bubalina .....	20
Quadro 3 - Medidas para controle e erradicação da brucelose conforme classe das Unidades Federativas.....	20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Conceito .....	4
2.2 Histórico .....	4
2.3 Etiologia .....	6
2.4 Epidemiologia.....	7
2.4.1 Distribuição Geográfica .....	7
2.4.2 Hospedeiros .....	11
2.4.3 Cadeia Epidemiológica.....	11
2.5 Patogenia .....	12
2.6 Manifestações Clínicas.....	13
2.7 Lesões .....	14
2.8 Diagnóstico .....	15
2.9 Tratamento.....	19
2.10 Medidas de Controle .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 Comitê de Ética de Experimentação Animal.....	28
4.2 Procedência dos Animais .....	28
4.3. Randomização da População Amostral.....	28
4.4 Coleta de Amostra Sanguínea.....	29
4.5 Testes Laboratoriais .....	29
4.6 Análise dos Resultados .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por bactérias do gênero *Brucella* sp. Possui distribuição mundial, apresentando-se na forma endêmica em muitos países, resultando em consideráveis prejuízos econômicos aos sistemas de produção, tanto de corte quanto de leite, além de graves implicações na sanidade animal e saúde pública, tendo em vista seu caráter zoonótico (ALVES e VILLAR, 2011; BRASIL, 2006).

A principal fonte de infecção da *Brucella abortus* é representada pela vaca prenhe, que elimina grandes quantidades do agente por ocasião do abortamento ou parto, contaminando pastagens, água, alimentos e fômites. A porta de entrada mais importante é o trato digestório, sendo que a infecção se inicia quando um animal suscetível ingere água, alimentos contaminados ou pelo hábito de lamber as crias recém-nascidas (BRASIL, 2006; CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990; KO e SPLITTER, 2003).

Em 1975, foi realizado o diagnóstico da doença em algumas regiões brasileiras. Na região Sul foram encontrados 4,0% de animais soropositivos; na região Sudeste, cerca de 7,5%; e nas regiões Centro-oeste, Nordeste e Norte, os valores foram de 6,8%, 2,5% e 4,1%, respectivamente (ALVES e VILLAR, 2011; BRASIL, 2006).

Os primeiros estudos com metodologia padronizada para determinar a prevalência da brucelose foram realizados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rondônia, Santa Catarina, Sergipe e no Distrito Federal, cujas prevalências da brucelose em bovinos variaram de 0,06% a 10,20% (ALVES et al., 2009; AZEVEDO et al. 2009; CHATE et al., 2009; DIAS, J.A. et al., 2009; DIAS, R.A. et al., 2009; GONÇALVES et al. 2009a; GONÇALVES et al. 2009b; KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009; MARVULO et al., 2009; NEGREIROS et al., 2009; ROCHA et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009; SILVA et al., 2009; VILLAR et al., 2009). No estado do Tocantins Ogata et al. (2009) apresentou uma prevalência de 4,43%, entretanto, na microrregião de Araguaína/TO, Baptista et al. (2012) determinaram a prevalência da brucelose em 6,17%.

Para o Brasil, maior exportador mundial de carne bovina, que possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com 208,3 milhões de cabeças (ABIEC, 2016), e para o estado do Tocantins que exporta carne bovina para mais de 20 países, cujo rebanho é de mais de oito milhões de cabeças (SEAGRO, 2016), tais prevalências provocam um impacto negativo sobre a cadeia produtiva de bovinos.

Santos et al. (2013) estimaram as perdas resultantes da brucelose bovina no Brasil em R\$ 420,12 ou R\$ 226,47 para cada fêmea infectada acima de 24 meses de idade em rebanhos de leite e corte, respectivamente, e que a cada 1% de variação na prevalência, estima-se a variação de 155 milhões de reais no custo da brucelose bovina no Brasil.

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ciente da necessidade de promover o controle dessa doença, desenvolveu e lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2006). A estratégia de atuação do PNCEBT é baseada na classificação das Unidades da Federação quanto ao grau de risco para a brucelose e tuberculose e na definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados conforme essa classificação (BRASIL, 2017).

Dentre as medidas compulsórias estão a vacinação obrigatória de fêmeas, entre três e oito meses de idade, utilizando dose única de vacina atenuada liofilizada, elaborada com cepa 19 de *B. abortus* lisa (B-19), que visa baixar a prevalência e a incidência dessa enfermidade; o controle do trânsito interestadual de animais destinados à reprodução bem como dos bovinos e bubalinos destinados à participação em aglomerações de animais, com o objetivo de evitar a disseminação da brucelose (BRASIL, 2017).

A vacinação dessas fêmeas deve ser executada sob a responsabilidade técnica de médico veterinário cadastrado no Serviço Veterinário Oficial (SVO), visto que a vacina B-19 pode causar orquite nos machos e provocar abortamento se administrada durante a prenhez, portanto, não é recomendada a vacinação de machos ou fêmeas prenhes com a cepa B-19 (BRASIL, 2006, 2017).

Além da vacina com a cepa B-19, existe também a vacina indutora de anticorpos não aglutinantes, cepa RB-51, elaborada com uma cepa de *B. abortus* rugosa atenuada, originada da cepa lisa virulenta 2308 que sofreu passagens sucessivas em meio contendo concentrações subinibitórias de rifampicina. A cepa RB-51 é a vacina oficial do programa de controle da brucelose nos EUA, do México e do Chile (BRASIL, 2006).

No Brasil, a vacina RB-51 pode ser empregada para a vacinação de fêmeas bovinas com idade superior a oito meses e em regiões onde as características geográficas restrinjam o manejo das explorações pecuárias a um período limitado do ano (BRASIL, 2017). No estado do Tocantins, de acordo com a Portaria nº 162, de 09 de maio de 2013, torna obrigatória em todo o estado a vacinação contra brucelose, com vacina RB-51, de fêmeas bovinas e bubalinas, com idade acima de oito meses, que não foram vacinadas entre três e oito meses de idade com vacina B-19 e situações de controle de focos da doença (TOCANTINS, 2013).

O objetivo da utilização da vacinação com brucelina, cepa B-19, é baixar a taxa de infecção em zonas de alta prevalência, propiciando a erradicação da doença. Quando a imunização é aplicada sistematicamente numa região, existe uma redução gradual da frequência da brucelose. Quando a cobertura vacinal atinge 80%, a prevalência da doença será inferior a 2,0% (OMS, 1986). Lemos e Leal (2008) afirmam que se todas as fêmeas forem vacinadas, entre 3 e 8 meses de idade, em 5 a 7 anos após a implantação do

programa de vacinação compulsória, a prevalência da brucelose bovina será menor que 2,0%, independente da prevalência inicial.

Desde 2011, o estado do Tocantins vem apresentando índice médio de cobertura vacinal acima de 80% em bezerras vacinadas com a cepa B-19 de *B. abortus*, cuja prevalência de focos em 2015 foi de 6,42% (IC 95% [4,76% a 8,62%]) (BARBOSA e OSÓRIO, 2017; ADAPEC/TO; comunicação pessoal) o que classificaria o estado do Tocantins como risco médio para brucelose conforme critério de risco adotado pelo MAPA. Mediante essa classificação de risco a principal medida sanitária a ser adotada é a vacinação em massa das bezerras com três a oito meses de idade com cobertura vacinal mínima de 80% (BRASIL, 2017).

A credibilidade das medidas propostas no Programa está diretamente associada às ações de monitoramento e fiscalização por parte do SVO que certificará a qualidade e a eficácia das medidas sanitárias, atuando em seus pontos críticos. Sendo a vacinação de bezerras contra brucelose um ponto crítico no âmbito do PNCEBT, a realização deste estudo é justificada pela necessidade de subsidiar informações ao SVO sobre o ponto crítico identificado, servindo de parâmetro para a implantação de ações que permitam um maior controle sobre o processo de vacinação desses animais.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONCEITO

A brucelose bovina é uma antropozoonose com distribuição mundial, causada pela bactéria *B. abortus*. Nos bovinos, os sinais clínicos da infecção são abortamentos no terço final da prenhez, retenção de placenta, natimortos e nascimento de bezerros fracos (CARVALHO NETA et al., 2010; PAULIN e FERREIRA NETO, 2002; POESTER, SAMARTINO e SANTOS, 2013).

Não há especificidade do microrganismo quanto aos hospedeiros que infectam, mas existe predileção por determinadas espécies animais. Sendo assim, bovinos e bubalinos geralmente são acometidos por *B. abortus*, microrganismo capaz também de infectar o homem, sendo reportado 500.000 casos da doença anualmente em seres humanos (DEPARTMENT FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT UK 2012; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

Essa doença resulta em importantes perdas econômicas por aumento do intervalo entre partos, redução da taxa de nascimento de bezerros, redução na produção de carne e leite e aumento da taxa de reposição animal (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003). Por ser uma zoonose de distribuição mundial e que causa vultosos prejuízos econômicos à produção pecuária, a brucelose recebeu uma maior atenção por parte do MAPA, o que resultou na criação, em 2001, do PNCEBT (PEREIRA et al., 2015).

### 2.2 HISTÓRICO

Hipócrates já havia citado, na Grécia, quatro séculos antes de Cristo, a existência de uma febre do tipo renitente, intermitente e debilitante acompanhada por suores noturnos, com piora progressiva dos enfermos e maior frequência no verão, sintomas atribuíveis à brucelose. Mas foi somente em 1859 que a enfermidade foi reconhecida como entidade nosológica autônoma por Marston, que contraiu brucelose na Ilha de Malta (BEER, 1999).

Em 1886, David Bruce, médico inglês, foi a Malta estudar uma doença febril que acometia os soldados ingleses e, em soldados mortos pela doença, observou numerosos organismos cocoides. No ano seguinte, mediante culturas, isolou e descreveu a presença do agente no baço desses soldados mortos pela febre de Malta, o qual denominou *Micrococcus melitensis* (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Em 1885, Nocard observou organismos cocoides em casos de abortos em bovinos, entretanto, foram Bang e Stribolt que em 1897 cultivaram e isolaram o agente dos abortos, mostrando ser o aborto epizootico das vacas igualmente provocado por um bacilo ao qual deram o nome de *Bacillus abortus infectiosi* (CORRÊA e CORRÊA, 1992; FERREIRA e FERREIRA, 1990).

Em 1896, Wright idealizou uma soroaglutinação lenta com cultivos do agente da febre de Malta. Em 1905, Zammit, sob coordenação de David Bruce, em Malta, verificou que o soro de grande proporção de cabras maltesas apresentava reação positiva com o antígeno de Wright, e que seu leite continha o agente. Zammit observou também que era possível isolar o microrganismo do sangue e da urina de pessoas doentes que apresentavam hipertermia acima de 39°C (CORRÊA e CORRÊA, 1992; FERREIRA e FERREIRA, 1990).

Alice Evans em 1918, nos EUA, demonstrou que as bactérias isoladas por Bruce e por Bang eram similares e propôs o nome genérico *Brucella*, em homenagem ao pesquisador inglês, o qual foi aceito oficialmente em 1920 para designar duas espécies, respectivamente, *B. abortus* e *B. melitensis* (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Traum em 1914, nos EUA, isolou de suínos um microrganismo similar aos agentes da febre de Malta e dos abortos bovinos de Bang Huddleson; em 1928, propôs a distinção de uma nova espécie, *B. suis* (CORRÊA e CORRÊA, 1992; FERREIRA e FERREIRA, 1990).

Em 1953, Buddle e Boyes, na Austrália, isolaram de ovinos uma nova espécie que foi denominada *B. ovis*. Em 1957, nos EUA, Stöenner e Lachman isolaram de um rato do deserto (*Neotoma lepida*), outra espécie que denominaram *B. neotomae*, que até hoje não se mostrou patogênica para os animais domésticos e o homem. Em 1966, também nos EUA, Carmichael isolou de cães uma espécie que mostrava patogenicidade para cães e para o homem, denominando-a *B. canis* (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

A partir da década de 1990 novas cepas de brucelas foram isoladas a partir de mamíferos marinhos, destacando *B. ceti* sp. nov. que tem como hospedeiro os cetáceos marinhos e *B. pinnipedialis* sp. nov. cujo hospedeiro são as focas (FOSTER et al., 2007).

Na cidade de Morávia do Sul, na República Tcheca, no ano de 2000, pesquisadores isolaram uma cepa de *B. microti* sp. nov. a partir do fígado de um roedor silvestre da espécie *Microtus arvalis* (SCHOLZ et al., 2008).

Em 2005, uma cepa de *B. inopinata* sp. nov. foi isolada de uma infecção de implante mamário em uma paciente norte-americana de 71 anos de idade que apresentava sinais clínicos de brucelose (SCHOLZ et al., 2010).

No Brasil, o primeiro relato foi em 1914, Danton Seixas diagnosticou clinicamente pela primeira vez a brucelose bovina no Rio Grande do Sul. Em 1917, no Ceará, Thomaz Pompeu Sobrinho observou casos raros de abortamento bovino, sem verificar um padrão de ocorrência epidêmica (BRASIL, 1988).

Tineciro Icbaci, por meio de pesquisas epidemiológicas e exames microscópicos de tecidos provenientes de fetos abortados, descreveu um foco de brucelose bovina ocorrido no município paulista de São Carlos em 1922. Alguns anos depois, em 1928, Mello e Neiva,

conseguiram isolar *B. abortus* do sangue de uma vaca que havia abortado (PAULIN et al., 2002).

Em 1931, Sílvio Torres verificou a existência de oito animais soropositivos para brucelose e 19 suspeitos em um lote de 51 bovinos importados. Com base nesses resultados, em 1933 César Pinto propôs a implementação de protocolo de testes em animais importados como forma de impedir a disseminação da doença no país. Em 1936, utilizando o sorodiagnóstico, Desidério Finamor detectou a brucelose bovina pela primeira vez no Rio Grande do Sul, e propôs um plano para o seu combate (BRASIL, 1988).

Thiago de Mello, em 1950, relatou a disseminação da brucelose bovina por todo o país apontando para uma prevalência de 10% a 20%, sendo que os índices mais altos estavam nas regiões leiteiras do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (GARCIA-CARRILLO, 1987). Entre 1950 e 1974, vários estudos sorológicos foram conduzidos, entretanto, somente em 1975 foi realizado o primeiro estudo soroepidemiológico nacional pelo Ministério da Agricultura (PAULIN et al., 2002).

### 2.3 ETIOLOGIA

Os microrganismos do gênero *Brucella* spp. são bactérias Gram-negativas, extracelulares facultativas que se apresentam na forma de cocobacilos ou bastonetes curtos, medindo 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  de largura por 0,6 a 1,5  $\mu\text{m}$  de comprimento, arranjados isoladamente e raramente formando cadeias curtas. Não possuem cápsula, são imóveis, e não formam endósporo. São aeróbios, alguns necessitam de 5% a 10% de  $\text{CO}_2$  para crescimento ou isolamento e crescem bem em temperatura entre 20°C e 40°C, sendo 37°C a temperatura ideal (OIE/WHO, 2012).

Em bovídeos, a brucelose é causada por bactérias da espécie *B. abortus*. Outras espécies, tais como, *B. suis*, *B. melitensis* e *B. ovis* também podem causar brucelose nos bovinos quando estes estão em contato com suínos, caprinos e ovinos, que são, respectivamente, os hospedeiros naturais daqueles agentes (ACHA e SZYFRES, 2001; OIE/WHO, 2012). Ressalta-se que *B. melitensis* é exótica no Brasil (BRASIL, 2006).

Existem sete biovariedades de *B. abortus*, sendo diferenciadas uma das outras por provas bioquímicas com sensibilidade aos corantes tionina e fuccina básica, requerimento de  $\text{CO}_2$ , produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e presença de antígenos de superfície (A ou M) (ALTON et al., 1988).

Outra classificação de *Brucella* spp. é em relação à morfologia da colônia, dividindo-se em dois grupos, a saber: lisa e rugosa. Estas diferenças coloniais são decorrentes da presença ou não da cadeia de lipopolissacarídeos "O", que é um componente químico localizado na superfície externa de *Brucella* spp., determinando a característica lisa ou

rugosa, respectivamente, da colônia (ALTON et al., 1988). Essa informação é relevante no diagnóstico da doença, visto que os testes de diagnóstico foram desenvolvidos com o objetivo de detectar anticorpos contra a cadeia “O” (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

As bactérias do gênero *Brucella* spp. podem resistir em fluidos corporais dos animais e no ambiente por períodos prolongados sob circunstâncias favoráveis, tais como: presença de sombra, umidade alta e baixas temperaturas. *B. abortus* pode permanecer nas pastagens por mais de seis meses, em material de aborto ou parto. É sensível à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, que em concentrações adequadas, podem ser utilizados na desinfecção de instalações, ambiente e fômites (CRAWFORD; HUBER e ADAMS, 1990; RUSSEL e KOULIKOVSKII, 1984).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

### 2.4.1 Distribuição geográfica

A brucelose possui distribuição mundial e causa vultosos prejuízos econômicos para a cadeia produtiva de carnes e leite. Essa doença pode ter uma disseminação considerável e, com frequência, muito rápida, devido à progressiva intensificação da produção leiteira e de corte, assim como pelas aglomerações de animais, sempre que não sejam tomadas as medidas apropriadas de combate e de proteção (ALVES e VILLAR, 2011).

Em 1975, foi realizado um diagnóstico da doença em algumas regiões brasileiras. Na região Sul foram encontrados 4,0% de animais soropositivos para essa doença; na região Sudeste, cerca de 7,5%; e nas regiões Centro-oeste, Nordeste e Norte, os valores encontrados foram de 6,8%, 2,5% e 4,1%, respectivamente (ALVES e VILLAR, 2011; BRASIL, 2006).

Posteriormente, foram realizados apenas cinco inquéritos epidemiológicos em alguns estados brasileiros. No Rio Grande do Sul, a prevalência de 2,0% em 1975 foi para 0,3% em 1986; em Santa Catarina, passou de 0,2% em 1975 a 0,6% em 1996 e; Mato Grosso do Sul apresentou 6,3% em 1998, a mesma porcentagem apresentada pela região mato-grossense em 1975; em Minas Gerais passou de 7,6% em 1975 para 6,7% em 1980, porém em 2002 chegou-se a um valor aproximado de 1,0% da prevalência da doença; no Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% de bovinos positivos em 1989. Os dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais positivos no Brasil se manteve entre 4,0% e 5,0% no período de 1988 a 1998 (BRASIL, 2006; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Em 2001, foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2006). Pouco tempo depois de lançar o PNCEBT, o Comitê Científico

do Centro de Colaboração em Sanidade Animal com sede na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo orientou o MAPA a padronizar uma metodologia para realização de um estudo de prevalência nas unidades da Federação, com objetivo de determinar as estratégias mais apropriadas de gerenciamento do programa (POESTER et al., 2009).

Esse Comitê formado por servidores do MAPA, por especialistas de várias instituições de ensino e pesquisa em Medicina Veterinária no Brasil, bem como por pesquisadores estrangeiros e individuais com experiência reconhecida na área, coordenou este estudo de caracterização epidemiológica da brucelose e tuberculose no Brasil. Esses estudos foram realizados entre os anos de 1998 a 2004 e foram publicados em um suplemento especial do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, completamente dedicado à divulgação dos dados iniciais sobre a situação epidemiológica da brucelose em 15 estados brasileiros (FERREIRA NETO et al., 2016). Posteriormente, esse mesmo estudo foi realizado nos estados do Maranhão, Paraíba e Pernambuco (ALMEIDA et al., 2016; BORBA et al., 2013; CLEMENTINO et al., 2016) (Tabela 1).

Dados epidemiológicos revelaram detalhes a respeito da situação epidemiológica da brucelose em 18 unidades federativas, os quais abrangeram 85% do rebanho bovino brasileiro (FERREIRA NETO et al., 2016).

Os estados de Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rondônia, Santa Catarina e São Paulo realizaram um segundo estudo de prevalência da brucelose. Desses, a redução na prevalência de rebanhos infectados em decorrência do processo de vacinação foi observado apenas nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rondônia (Tabela 2; Figura 1 e 2) (ANZAI et al., 2016; BARDDAL et al., 2016; BAUMGARTEN et al., 2016; DIAS et al., 2016; INLAMEA et al., 2016; LEAL FILHO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

No estado de Santa Catarina, o segundo estudo transversal indicou que não houve alteração significativa na prevalência da brucelose. Sendo assim, a vacinação contra essa doença permanece proibida desde 2004 e o Estado tem iniciado a implantação de estratégias para a sua erradicação (BAUMGARTEN et al., 2016).

Apesar da ampla distribuição da brucelose bovina em todo território nacional, Ferreira Neto et al. (2016) afirmam que há uma grande heterogeneidade da frequência da doença entre as unidades da Federação e que a alta prevalência da brucelose tanto em rebanhos quanto em animais infectados pode ser observada na região meio-oeste do País, bem como nos estados vizinhos, os quais são reconhecidos como produtores de carne (Figura 1 e 2).

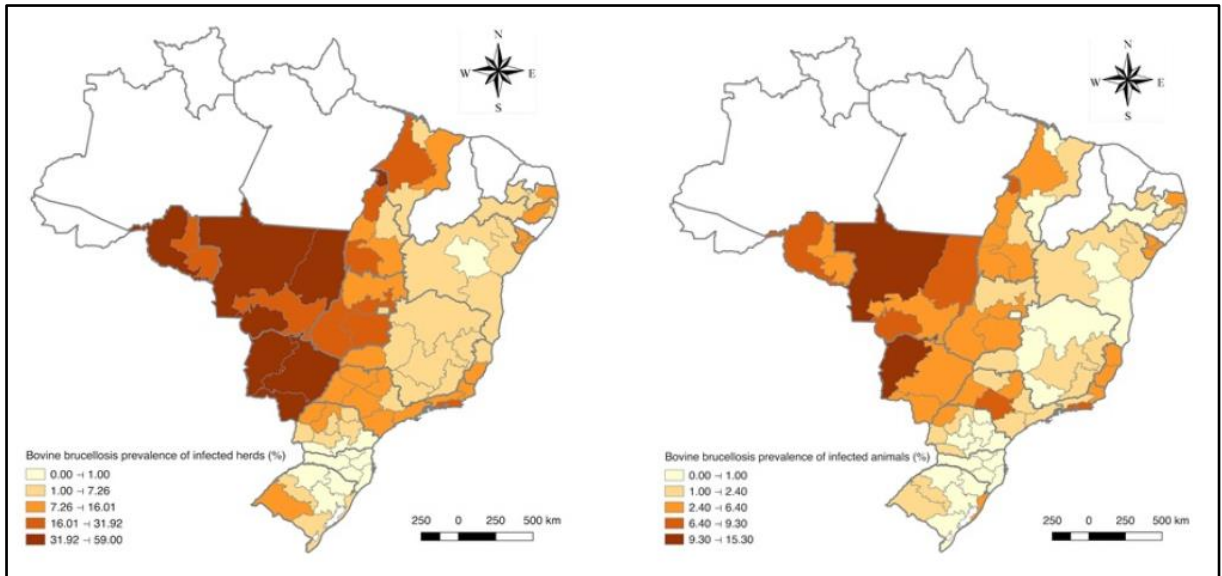
**Tabela 1** - Prevalência da brucelose bovina no Brasil.

ESTADO	PREVALÊNCIA EM		REFERÊNCIA
	REBANHO (%)	FÊMEAS > 24 M (%)	
Acre	-	-	-
Alagoas	-	-	-
Amapá	-	-	-
Amazonas	-	-	-
Bahia	4,20	0,66	Alves et al. (2009)
Ceará	-	-	-
Distrito Federal	2,52	0,16	Gonçalves et al. (2009a)
Espírito Santo	9,00	3,53	Azevedo et al. (2009)
Goiás	17,54	3,01	Rocha et al. (2009)
Maranhão	11,40	2,50	Borba et al. (2013)
Mato Grosso	41,20	10,20	Negreiros et al. (2009)
Mato Grosso do Sul	41,50	7,93	Chate et al. (2009)
Minas Gerais	6,04	1,09	Gonçalves et al. (2009b)
Pará	-	-	-
Paraíba	4,60	2,00	Clementino et al. (2016)
Paraná	4,02	1,73	Dias, J.A et al. (2009)
Pernambuco	4,50	1,40	Almeida et al. (2016)
Piauí	-	-	-
Rio de Janeiro	15,42	4,08	Klein-Gunnewiek et al. (2009)
Rio Grande do Norte	-	-	-
Rio Grande do Sul	2,06	1,02	Marvulo et al. (2009)
Rondônia	35,18	6,22	Villar et al. (2009)
Roraima	-	-	-
Santa Catarina	0,32	0,06	Sikusawa et al. (2009)
São Paulo	9,70	3,81	Dias, R.A et al. (2009)
Sergipe	12,60	3,36	Silva et al. (2009)
Tocantins	21,22	4,43	Ogata et al. (2009)

**Tabela 2** - Comparação entre o primeiro e segundo estudo da prevalência da brucelose bovina em rebanhos em estados brasileiros, com intervalo de aproximadamente 10 anos.

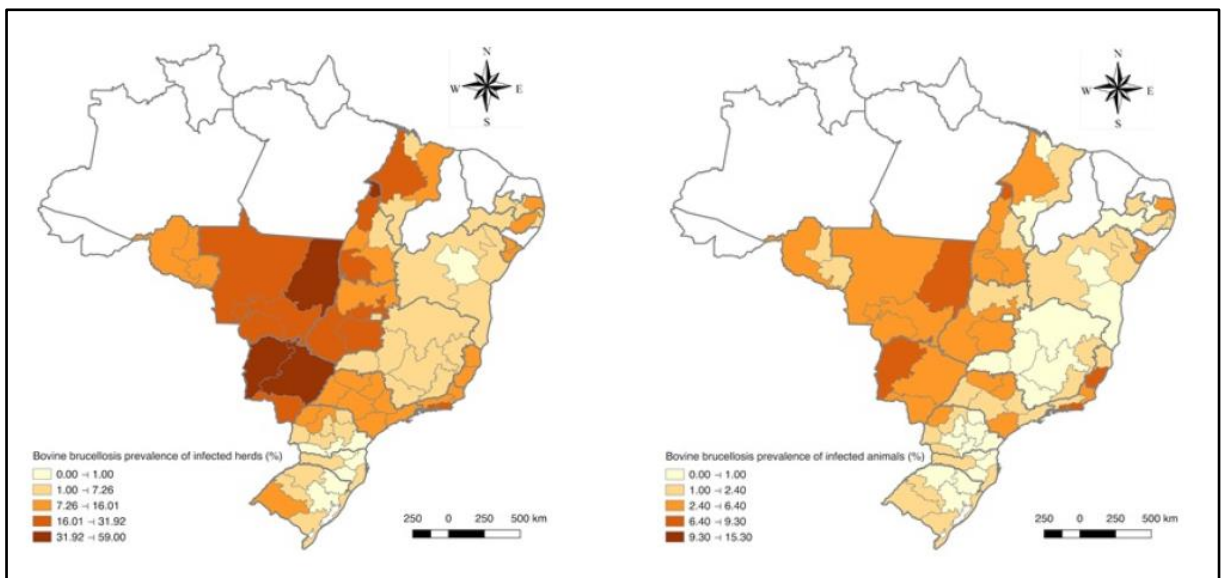
ESTADO	PRIMEIRO ESTUDO		SEGUNDO ESTUDO	
	ANO	P (%)	ANO	P (%)
Espírito Santo	2002/2003	9,00	2012/2014	9,30
Mato Grosso	2003	41,20	2014	24,00
Mato Grosso do Sul	1998	41,50	2009	30,06
Minas Gerais	2002	6,04	2011	3,59
Rio Grande do Sul	2004	2,06	2013	3,54
Rondônia	2004	35,18	2014	12,30
Santa Catarina	2001	0,32	2012	0,91
São Paulo	2001	9,70	2011	10,20

Fonte: Ferreira Neto et al. (2016), com adaptações.



**Figura 1** - Estudo de prevalência da brucelose realizado no Brasil entre os anos de 1998 e 2004.

Fonte: Ferreira Neto et al. (2016), com adaptações.



**Figura 2** - Estudo de prevalência da brucelose realizado no Brasil entre os anos de 2009 e 2014.

Fonte: Ferreira Neto et al. (2016), com adaptações.

Considerando a baixa prevalência na região sul do estado do Paraná e verificada a possibilidade de implantação das estratégias de erradicação, seria possível compor, com todo o estado de Santa Catarina e o norte do estado do Rio Grande do Sul, uma grande área de erradicação da brucelose no País (Figura 2) (DIAS, J.A et al., 2009).

### 2.4.2 Hospedeiros

O hospedeiro é o quinto elo na cadeia de infecção e é definido como uma pessoa ou animal que proporciona um local adequado para que um agente infeccioso cresça e se multiplique em condições naturais (BONITA, BEAGLEHOLE e KJELLSTRÖM, 2010).

No caso da brucelose, não há espécie-especificidade do microrganismo quanto aos hospedeiros que infectam, mas existe predileção por determinadas espécies animais. Sendo assim, os bovinos e bubalinos são acometidos por *B. abortus*; suínos e javalis são afetados pela *B. suis*; ovinos são hospedeiros da *B. melitensis* e *B. ovis*; caprinos são afetados pela *B. melitensis*. Nessas espécies a brucelose é considerada uma doença da esfera reprodutiva (CORREA e CORREA, 1992; NIELSEN et al., 2001; PAULIN et al., 2002; XAVIER et al., 2009b).

A brucelose também acomete a espécie equina reconhecida como doença infecciosa de evolução crônica, de potencial zoonótico e que raramente causa desordens reprodutivas, cujo agente é, predominantemente, *B. abortus*, podendo ser afetada também pela *B. suis* (ACHA e SZYFRES, 2001).

Várias espécies de *Brucella* spp. são capazes de infectar humanos, tendo *B. melitensis* um alto potencial zoonótico, seguida da *B. suis* e *B. abortus*. Em humanos, *B. melitensis* é a espécie mais patogênica podendo causar uma infecção crônica debilitante (FUGIER et al., 2007; YOUNG, 1995).

A brucelose é uma das zoonoses mais comum no mundo, com mais de 500.000 casos reportados anualmente em humanos, com cerca de 25.000 mortes registradas por ano, no mundo inteiro (CORRÊA e CORRÊA, 1992; DEPARTMENT FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT UK 2012; SELEEM, BOYLE e SRIRANGANATHAN, 2010).

### 2.4.3 Cadeia epidemiológica

A principal fonte de infecção da *B. abortus* é representada pela vaca prenhe, que elimina grandes quantidades do agente por ocasião do abortamento ou parto e em todo o período puerperal (até, aproximadamente, 30 dias após o parto), contaminando pastagens, água, alimentos e fômites. Desta forma, fetos abortados e membranas fetais são as principais vias de eliminação do agente (BRASIL, 2006; LEMOS e LEAL, 2008).

Após eliminação, *B. abortus* pode permanecer viável no meio ambiente por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, ampliando de forma significativa a chance de o agente entrar em contato e infectar um novo hospedeiro suscetível (BRASIL, 2006).

O touro infectado pode ser considerado uma fonte de infecção de *B. abortus*, entretanto, a sua participação na transmissão da brucelose pela monta natural não é



significativa, embora a maioria das espécies de *Brucella* spp. possa ser eliminada no sêmen. Na monta natural, a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção, entretanto, cuidados especiais devem ser tomados com a inseminação artificial, visto que o sêmen é aplicado diretamente no útero, onde não existem barreiras inespecíficas, tornando-se um ambiente propício para multiplicação do agente. A presença de touros positivos apenas indica que o rebanho está infectado (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008; LEMOS e LEAL, 2008).

Segundo Lemos e Leal (2008), bezerros nascidos de vacas infectadas são, na maioria das vezes, reagentes positivos até os quatro meses de idade, devido à presença de anticorpos no colostro, tornando-se negativos após esse período. Em algumas situações, a transmissão transplacentária pode ocasionar o nascimento de animais portadores latentes, cujo agente etiológico causa infecção persistente nos pulmões e linfonodos regionais desses animais que se mostram reagentes negativos aos testes de diagnóstico (PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Essas infecções latentes nos animais sorologicamente negativos têm grande importância porque passam despercebidas e esses animais podem servir como fonte de infecção algum tempo depois, visto que 2,5% a 9,0% de novilhas com infecção latente podem apresentar reações soropositivas a partir da metade de sua primeira prenhez, causando um impacto negativo em programas de erradicação da brucelose (LEMOS e LEAL, 2008; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Para Ferreira Neto et al. (2016) o fator de risco que mais contribui para a transmissão e disseminação da brucelose no Brasil é a introdução de animais nos rebanhos sem a exigência de testes de diagnóstico, que pode ser resolvido com um programa massivo de educação sanitária para informar aos produtores sobre a importância de testar animais reprodutores antes de introduzi-los em suas propriedades.

A porta de entrada mais importante para *B. abortus* no hospedeiro é o trato digestório, sendo que a infecção se inicia quando um animal suscetível ingere água e/ou alimentos contaminados ou ainda pelo hábito de lambe as crias recém-nascidas, entretanto, a infecção também pode ocorrer através da pele, conjuntiva ou mucosa respiratória por inalação, pois esses animais também possuem o hábito de cheirar fetos abortados (BRASIL, 2006; CRAWFORD, HUBER e ADAMS, 1990; KO e SPLITTER, 2003; LEMOS e LEAL, 2008).

## 2.5 PATOGENIA

Após a multiplicação inicial do microrganismo no hospedeiro vertebrado, há um curto período de bacteremia, e as bactérias vão se alojar em diversos órgãos, principalmente do

sistema linfático. A capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência de *B. abortus* no organismo (EAGLESOME e GARCIA, 1992; GORVEL e MORENO, 2002; THOEN, ENRIGHT e CHEVILLE, 1993; XAVIER et al., 2009a).

A viabilidade de *Brucella* spp. no interior das células fagocitárias é creditada à inibição da fusão dos lisossomos com os grânulos secundários, impedindo a formação dos fagolisossomos. No entanto, a resistência à lise intracelular é dependente da espécie de *Brucella* spp. e, também, da espécie animal (CARTER e CHENGAPPA, 1991; POESTER, GONÇALVES e LAGE, 2002).

Nos ruminantes domésticos, após a bacteremia, o microrganismo apresenta tropismo pela placenta e, posteriormente, pelo feto, levando à necrose dos placentomas que se tornam friáveis e cobertos com exsudato fibrinoso além de infecção fetal, provocando abortamento, sendo esse o principal sinal clínico em bovinos (METCALF, LUCHSINGER e RAY, 1994; NIELSEN, 1990; SCHLAFER e MILLER, 2007; XAVIER et al., 2009a).

O desenvolvimento da doença vai depender do estágio fisiológico do animal infectado. Animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção. *B. abortus* geralmente infecta linfonodos e glândula mamária em animais não prenhes (CRAWFORD; HUBER e ADAMS, 1990; NICOLETTI, 1980; SAMARTINO e ENRIGHT, 1993).

Na primeira prenhez após a infecção, a fêmea aborta, entretanto, os abortamentos são menos frequentes a partir da segunda prenhez após infecção e muito raro a partir da terceira prenhez. Isso se deve ao desenvolvimento da resposta imune celular que diminui a área e a intensidade das lesões em animais infectados. Sendo assim, a manifestação clínica passa a ser o nascimento de bezerras fracas ou natimortos (CORBEL, 2006; NICOLETTI, 1990a; THOEN, ENRIGHT e CHEVILLE, 1993).

*Brucella* spp. possui predileção por órgãos que oferecem elementos necessários para o seu metabolismo, como o eritritol (álcool polihídrico de quatro carbonos) presente no útero gravídico, glândula mamária, articulações e órgãos do sistema reprodutor do macho, entretanto, os humanos, equinos, coelhos e roedores possuem ausência ou baixa produção do eritritol, fato este que justificaria o reduzido impacto da brucelose no aparelho reprodutivo nessas espécies (CARTER e CHENGAPPA, 1991; RIBEIRO, MOTA e ALMEIDA, 2008; XAVIER, 2009).

## 2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O período de incubação é caracterizado pelo tempo transcorrido entre a exposição ao patógeno e o aparecimento dos sinais clínicos. Em bovinos esse período pode ser de poucas semanas e até mesmo de meses ou anos. Considerando o momento em que ocorre

a infecção, o período de incubação é inversamente proporcional ao tempo de prenhez, ou seja, quanto mais adiantada a prenhez, menor será o período de incubação. Em seres humanos o período de incubação da brucelose é muito variável, de uma a três semanas, mas pode prolongar-se por vários meses (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010).

As manifestações clínicas da brucelose em bovinos dependem da idade, estágio reprodutivo e imunológico, rota da infecção, virulência e desafio, natural ou experimental, da espécie de *Brucella* (ADAMS, 2002).

Nos bovinos, a doença evolui sem sinais clínicos aparentes, observando-se um maior número de infectados do que o de doentes. Os principais sinais clínicos da brucelose nas fêmeas são abortamentos, natimortos ou nascimentos de bezerros fracos, retenção de placenta e secreção vaginal purulenta e fétida além da infecção da glândula mamária (FERREIRA e FERREIRA, 1990; VERONESI e FOCACCIA, 1996, XAVIER et al., 2009a).

Nos machos, pode ocorrer uma fase inflamatória aguda, seguida de frequente cronicidade assintomática, momento em que as bactérias podem tornar-se latentes nos testículos, epidídimos e vesículas seminais. Um possível sinal clínico é a orquite uni ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume dos testículos que podem se apresentar com aspecto amolecido e purulento. As lesões articulares também podem ser observadas em estágios mais crônicos da doença (GORVEL e MORENO, 2002; LAGE et al., 2008; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

## 2.7 LESÕES

Os animais infectados por *B. abortus* desenvolvem lesões articulares que se caracterizam por bursite e artrite, assim como lesões na glândula mamária observadas em casos crônicos da doença. A placentite necrótica é a principal lesão encontrada nas fêmeas que abortam, podendo ainda ocorrer distensão uterina devido ao acúmulo de exsudato fétido e de coloração acastanhada, contendo material necrótico. Observa-se também hiperplasia de linfonodos internos e do baço (NICOLETTI, 1990b; THOEN, ENRIGHT e CHEVILLE, 1993; XAVIER et al., 2009a).

Microscopicamente, observa-se uma placentite necrótica associada à hemorragia, exsudato neutrofílico e retenção de tecido fetal nas criptas carunculares com infiltração perivascular de neutrófilos, linfócitos e histiócitos com pequenos focos de necrose que são observados nos pedúnculos carunculares. Na glândula mamária observa-se mastite neutrofílica com linfonodos mamários e ilíacos em variados graus de hiperplasia linfoide associada com neutrofilia. Endometrite multifocal ou difusa é caracterizada por ulceração superficial do endométrio com deposição de debris celular (XAVIER et al., 2009a).

Não há nenhuma lesão patognomônica da doença no feto abortado, porém pleurite fibrinosa, que pode estar associada à broncopneumonia supurativa e pericardite fibrinosa, ocorre com frequência, além de exsudato fibrinoso depositados sobre diversos órgãos da cavidade abdominal (NICOLETTI, 1990b; THOEN, ENRIGHT e CHEVILLE, 1993; XAVIER et al., 2009a).

As principais lesões microscópicas em fetos abortados são a pleurite e pericardite caracterizadas por exsudato fibrinoso e infiltração de neutrófilos, além de vasculite e trombose no parênquima pulmonar. Infiltrado neutrofílico nos bronquíolos e alvéolos associado com pneumonia intersticial, além de hepatite multifocal e difusa com infiltrado neutrofílico, esplenite, linfadenite também são observados nos fetos abortados (XAVIER et al., 2009a).

## 2.8 DIAGNÓSTICO

Os testes diretos de diagnóstico para brucelose são realizados a partir do cultivo, isolamento e a identificação do gênero *Brucella* oriundo de material de aborto ou de secreções como leite, sêmen e líquido sinovial de articulações comprometidas. Em casos de aborto, o material de eleição são os anexos placentários e o conteúdo gástrico, além do baço, fígado, pulmão e rins dos fetos abortados (CARTER e CHENGAPPA, 1991; NIELSEN et al, 2004; LAGE et al., 2008; VEJARANO RUIBAL, 2009).

*B. abortus* pode ser isolada a partir de amostras de fígado, baço, pulmões e rins, além dos linfonodos e trato genital, uma vez que após a bacteremia ocorre sua disseminação por meio da corrente sanguínea para todo organismo animal. Outros tecidos podem ser utilizados para diagnóstico direto, tais como, linfonodos retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos, pré-escapulares e ilíacos, mas principalmente os supramamários, onde o agente é isolado em quase 90% dos animais infectados (CAMPAÑA, GOTARDO e ISHIZUCA, 2003; GORVEL e MORENO, 2002; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; LIRA, 2008).

A bacteriologia possui alta especificidade e capacidade de diferenciação entre espécies e biovariedades. No entanto, o isolamento de *Brucella* spp. é um processo trabalhoso, sendo necessários dias para a identificação do agente visto a sensibilidade e as exigências com relação aos meios de cultivo, além de se constituir um patógeno de alto risco biológico, sendo necessários laboratórios com funcionários qualificados, instalações e equipamentos de proteção de nível 3 (POESTER, SAMARTINO e LAGE, 2005; LAGE et al., 2008).

Outro exame direto utilizado é o de imunohistoquímica de *paraffin wax-embedded tissues* (tecidos fixados em cera de parafina) para antígenos de *B. abortus* possuindo boa

sensibilidade e especificidade e podendo ser realizado em material de aborto após a fixação em formol, permitindo tanto a identificação do agente como a visualização de aspectos microscópicos do tecido examinado, tornando-se um valioso atributo para o estudo da patogenia da infecção pela bactéria (BRASIL, 2006; NIELSEN et al., 1998, 2004; PÉREZ et al., 1998).

A Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), técnica bastante sensível, detecta um segmento de DNA por meio da amplificação enzimática *in vitro*, facilitando o diagnóstico direto de doenças infecciosas pela identificação do ácido nucléico do agente, além de superar as limitações relacionadas ao isolamento por métodos tradicionais de cultura de *B. abortus* em material de aborto, em secreções e excreções (BRASIL, 2006; MULLIS e FALOONA, 1986; NIELSEN et al., 1998, 2004).

O desenvolvimento da PCR em Tempo Real resultou da complementação da técnica criada por Mullis e Faloona (1986) que possibilita o monitoramento da reação a cada momento, gerando resultados com maior sensibilidade, precisão, velocidade nas análises, facilidade na quantificação e menor risco de contaminação, já que a reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo a necessidade de eletroforese para a visualização das amplificações (NOVAIS e PIREZ ALVES, 2004).

Embora um diagnóstico definitivo e incontestável da brucelose possa ser obtido pelo isolamento do agente etiológico, esse procedimento é caro, demorado e exige recursos laboratoriais nem sempre disponíveis, o que inviabiliza seu uso em larga escala, como requer um programa de controle da enfermidade. Por essa razão, os programas de combate à brucelose baseiam-se no diagnóstico sorológico, recurso que permite a realização de um grande número de testes, com resultados adequados e a um custo acessível (MATHIAS, MEIRELLES e BUCHALA, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017, estabeleceu como oficiais os testes de diagnóstico indireto: antígeno acidificado tamponado (AAT), teste do anel em leite (TAL), 2-mercaptoetanol (2-ME), teste de polarização fluorescente (TPF) e reação de fixação de complemento (RFC), sendo esse último utilizado para o trânsito internacional de animais (BRASIL, 2017).

O teste de AAT é de triagem e tem como vantagem a agilidade no diagnóstico além de ser um teste que apresenta baixo custo na sua execução, entretanto, pode resultar em reações falso-positivas decorrentes da presença de anticorpos inespecíficos presentes nas infecções por outras bactérias (*Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O:157 ou *Pseudomonas* sp.) ou podem decorrer como resultado da vacinação de bezerras com a vacina B-19 após oito meses de idade. Já as reações falso-negativas podem ocorrer durante o período de incubação da doença, no periparto ou ainda devido às variações

individuais de resposta à vacinação ou infecção de cada animal (FERRAZ, 1999; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; OIE/WHO, 2012).

O TAL foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Os antígenos utilizados são corados com hematoxilina, que dá a cor azul característica à reação positiva. Caso existam anticorpos no leite, eles se combinarão com antígeno formando uma malha de complexo antígeno-anticorpo que, por sua vez, será arrastada pelos glóbulos de gordura, fazendo com que se forme um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva). Na ausência de anticorpos, o anel de creme terá a coloração branca, e a coluna de leite permanecerá azulada (reação negativa) (BRASIL, 2006).

Para evitar as reações falso-positivas ou falso-negativas deve-se utilizar o 2-ME como teste confirmatório. O 2-ME contém tioglicol que degrada os anticorpos com configuração pentamérica (classe IgM) em subunidades, incapazes de formar complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação (BRASIL, 2006; CAVALLÉRO, 1998; MEGID et al., 2000; OIE/WHO, 2012).

O teste de soroaglutinação lenta em tubos (SAT) é uma prova utilizada em associação com o teste do 2-ME para confirmar resultados positivos em provas de rotina. A prova permite identificar uma alta proporção de animais infectados, porém, costuma apresentar resultados falso-negativos, no caso de infecção crônica e, em algumas situações, podem aparecer títulos significativos em animais não infectados por *B. abortus* como decorrência de reações cruzadas com outras bactérias. Sendo assim, resultados positivos na SAT e negativos no 2-ME devem ser interpretados como reações inespecíficas ou como devido a anticorpos residuais de vacinação com cepa B-19. Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são aglutininas relacionadas à infecção, devendo os animais ser considerados infectados (BRASIL, 2006).

A combinação dos testes SAT e 2-ME tem como desvantagens maior tempo para obtenção do resultado (48 horas) quando comparados com testes de triagem; gasto de grande quantidade de reagente; grandes espaços ocupados no laboratório quando são testadas muitas amostras; uso de substância tóxica; e necessidade das amostras de soro estarem em condições ótimas de conservação (CHAPPEL, 1989).

Os resultados positivos obtidos no 2-ME estão relacionados com a infecção, porém, animais com os resultados inconclusivos poderão ser, a critério do médico veterinário responsável pela coleta, retestados em um intervalo de 30 a 60 dias, usando o teste do 2-ME, sendo classificados como reagentes positivos se apresentarem no reteste resultado positivo ou segundo resultado inconclusivo. Esses animais também poderão ser submetidos, em até 30 dias, ao teste de RFC ou TPF ou destinados ao abate sanitário ou à eutanásia (BRASIL, 2017).

A RFC é um dos testes usados no diagnóstico confirmatório da brucelose bovina, e para sua realização emprega-se o mesmo antígeno usado na prova de soroprecipitação lenta. A microtécnica utilizada no teste de RFC foi desenvolvida por Alton et al. (1988), com incubação a 37°C por 30 minutos nas duas fases da reação sendo considerado positivo o soro com pelo menos 25% de fixação de complemento na diluição 1:4 (MATHIAS, MEIRELLES e BUCHALA, 2007).

A RCF é uma técnica bastante laboriosa, exigindo equipe altamente treinada para obtenção de resultados confiáveis; uso de reagentes lábeis que precisam ser constantemente preparados e titulados. Além disso, existe a possibilidade de ocorrência de atividade anticomplementar e efeito prozona, que pode levar à obtenção de resultados falso-negativos (CHAPPEL, 1989).

Considerando as desvantagens dos testes anteriormente aprovados, o MAPA adotou o TPF como teste único ou como teste confirmatório em animais reagentes ao teste AAT ou inconclusivos ao teste do 2-ME. Os animais inconclusivos ao TPF poderão ser, a critério médico veterinário responsável pela coleta, retestados entre 30 e 60 dias, usando o mesmo teste, sendo classificados como positivos se apresentarem, no reteste, resultado positivo ou segundo resultado inconclusivo; ou submetidos, em até 30 dias, ao teste de RFC; ou destinados ao abate sanitário ou à eutanásia (BRASIL, 2017).

O TPF baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel, marcado com fluorocromo, e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Uma molécula menor gira aleatoriamente a uma velocidade maior, resultando em rápida despolarização da luz, ao passo que um complexo maior gira mais lentamente, e a despolarização da luz ocorre a uma taxa mais reduzida. Essa mudança na despolarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente. Esse teste tem a capacidade de combinar elevada sensibilidade (99,02%) com elevada especificidade (99,96%), possuindo também elevada especificidade mesmo quando utilizado para testar soros de animais vacinados com a cepa B-19, visto que esse teste possui a capacidade de discriminar anticorpos decorrentes de vacinação daqueles decorrentes de infecção (NIELSEN et al., 1996, 1998; NIELSEN e GALL, 2001).

O uso do protocolo AAT para triagem, sendo a confirmação dos resultados positivos efetuada pela combinação do teste de SAT com o teste do 2-ME ou pela RFC apresenta sensibilidade e especificidade estimadas de 95% e 99,5%, respectivamente (GONÇALVES et al., 2009b).

Os médicos veterinários cadastrados no SVO podem realizar apenas os testes de triagem AAT e TAL para o diagnóstico da brucelose. Os testes confirmatórios 2-ME, RFC e TPF devem ser realizados somente por laboratórios oficiais ou credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2017). Até o ano de 2015 existiam apenas 10 laboratórios credenciados pelo

MAPA e dois laboratórios oficiais (Quadro 1), entretanto, um aumento na demanda por testes de diagnósticos confirmatórios poderá determinar um provável aumento na rede de laboratórios credenciados (FERREIRA NETO et al., 2016).

**Quadro 1** - Distribuição de laboratórios credenciados pelo MAPA e oficiais no Brasil

ESTADO	LABORATÓRIOS	
	CERTIFICADOS	OFICIAIS
Distrito Federal	1	0
Goiás	1	0
Maranhão	1	0
Minas Gerais	2	1
Pará	0	1
Paraná	2	0
Rio Grande do Sul	1	0
Santa Catarina	1	0
São Paulo	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

Fonte: FERREIRA NETO et al. (2016).

O art. 24 da Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017 orienta que os testes de diagnóstico para brucelose deverão ser realizados em fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses, desde que vacinadas com a cepa B-19; fêmeas com idade igual ou superior a oito meses, se vacinadas com a cepa RB-51 ou não vacinadas; machos com idade igual ou superior a oito meses, destinados à reprodução (BRASIL, 2017).

## 2.9 TRATAMENTO

A legislação brasileira proíbe o tratamento de animais positivos para brucelose, devendo estes serem marcados, pelo médico veterinário responsável pelo exame, a ferro candente ou nitrogênio líquido, no lado direito da cara com um “P” contido num círculo de oito centímetros de diâmetro, isolados de todo rebanho, afastados da produção leiteira e abatidos no prazo máximo de 30 dias após o diagnóstico em estabelecimento sob serviço de inspeção oficial ou eutanasiados no estabelecimento de criação, conforme normatizado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, por médico veterinário do SVO (BRASIL, 2017).

## 2.10 MEDIDAS DE CONTROLE

O PNCEBT tem como objetivos específicos baixar a prevalência e a incidência da brucelose visando a erradicação. Sua estratégia de atuação é baseada na classificação das Unidades da Federação (UF) quanto ao grau de risco para brucelose, determinadas pelas prevalências da brucelose estimadas por estudos padronizados pelo MAPA, e na definição de procedimentos de defesa sanitária animal a serem adotados de acordo com essa



classificação, levando em consideração a execução dessas ações propostas em plano de ação apresentado pelo SVO e aprovado pelo Departamento de Sanidade Animal do MAPA (Quadro 2) (BRASIL, 2017).

**Quadro 2** - Classificação de risco para brucelose bovina e bubalina.

PREVALÊNCIA DE FOCOS (%)	CLASSE	NÍVEL			
		INICIAL	QUALIDADE DA EXECUÇÃO DAS AÇÕES		
			BAIXA	MÉDIA	ALTA
< 2	A	0	1	2	3
≥ 2 e < 5	B	0	1	2	3
≥ 5 e < 10	C	0	1	2	3
≥ 10	D	0	1	2	3
Desconhecida	E	0	0	0	0

Fonte: Brasil (2017).

Onde: E0 - risco desconhecido; D0, D1, D2 e D3 - risco alto; C0, C1, C2 e C3 - risco médio; B0, B1 e B2 - risco baixo; B3, A0, A1 e A2 - risco muito baixo; A3 - risco desprezível.

Para a evolução no controle e erradicação da brucelose, deverão ser adotados os procedimentos de saneamento de focos, a vigilância epidemiológica, a vacinação contra brucelose com cobertura vacinal acima de 80% e estudos epidemiológicos conforme a classificação das Unidades Federativas (Quadro 3) (BRASIL, 2017):

**Quadro 3** - Medidas para controle e erradicação da brucelose conforme classe das Unidades Federativas.

CLASSE	MEDIDAS
A	Saneamento obrigatório de focos e vigilância epidemiológica para detecção de focos
B	Vacinação contra brucelose com cobertura vacinal de animais acima de 80%; saneamento obrigatório de focos e vigilância epidemiológica para detecção de focos
C	Vacinação contra brucelose com cobertura vacinal de animais acima de 80%
D	Vacinação contra brucelose com cobertura vacinal de animais acima de 80%
E	Vacinação contra brucelose com cobertura vacinal de animais acima de 80% e estudo epidemiológico de brucelose

Fonte: Brasil (2017).

A vacinação das fêmeas deve ser executada sob a responsabilidade técnica de médico veterinário cadastrado no SVO, utilizando dose única de 2 mL de vacina atenuada liofilizada, elaborada com cepa 19 de *B. abortus* lisa (B-19), onde se vacina fêmeas bovinas e bubalinas entre três e oito meses de idade. A vacina B-19 pode causar orquite nos machos e provocar aborto se administrada durante a prenhez, portanto, não se recomenda a vacinação de machos ou fêmeas prenhes com a cepa B-19 (BRASIL, 2006; 2017).

Essa vacina apresenta características importantes tais como: permitir uma única vacinação em fêmeas entre três e oito meses de idade conferindo imunidade prolongada;

ser estável e não se multiplicar na presença de eritritol; ser atenuada para fêmeas jovens, causando reações mínimas após a sua aplicação; além de conferir proteção em 70% a 80% dos animais vacinados (BRASIL, 2006, NICOLETTI, 1980; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003).

Por se tratar de uma vacina viva atenuada, a B-19 pode causar a doença no homem em caso de inoculações acidentais durante o processo de vacinação do rebanho. Outra importante desvantagem é que essa vacina é fabricada a partir de cepa lisa de *B. abortus*, que induz a produção de anticorpos contra o polissacarídeo-O, interferindo no diagnóstico sorológico caso as fêmeas bovinas ou bubalinas sejam vacinadas em idade acima dos oito meses, pois, após esta idade há probabilidade de uma grande produção de anticorpos que podem perdurar e interferir no diagnóstico da doença aos 24 meses de idade (BRASIL, 2006; LAGE et al., 2008).

Segundo o regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra a brucelose o número de microrganismos viáveis não pode ser inferior a  $60 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por dose e nem superior a  $120 \times 10^9$  UFC por dose na data de liberação e não deve ser inferior a  $40 \times 10^9$  UFC por dose ao fim do prazo de validade. Para manter essa viabilidade os frascos da vacina devem ser armazenados em temperatura de refrigeração entre 2°C e 8°C e o prazo de validade não deve ser superior a 24 meses (BRASIL, 2004). Entretanto em um estudo de avaliação de bactérias viáveis e do ensaio de estabilidade térmica no controle de produção de vacinas cepa B-19 comercializadas no Brasil, Caldeira (2008) observou um percentual 42% de reprovação na data de vencimento em vacinas com prazo de validade acima de 12 meses em virtude do número de microrganismos viáveis estarem abaixo de  $40 \times 10^9$  UFC por dose.

Os problemas de falhas vacinais relacionados com a fabricação de vacinas são incomuns sendo a falha de uma vacina eficiente atribuída na maioria das vezes a uma administração insatisfatória. Essas falhas também podem ser decorrentes de um mau armazenamento, do uso de antibióticos em conjunto com vacinas bacterianas vivas e do uso de produtos químicos para esterilizar seringas (TIZARD, 2002).

Existem situações em que o animal recebe a dose adequada, entretanto, se estiver incubando a doença antes da inoculação, a vacina pode ter sido administrada tardiamente para afetar o curso da doença. O animal também pode falhar em montar uma resposta imune, que por ser um processo biológico, nunca confere uma proteção absoluta e nunca é equivalente em todos os membros de uma população vacinada, portanto, é impossível garantir 100% de proteção em uma população aleatória de animais por meio da vacinação (TIZARD, 2002).

As falhas vacinais também ocorrem quando o animal está imunossuprimido em decorrência de processos infecciosos virais ou parasitários, estresse térmico, desnutrição e

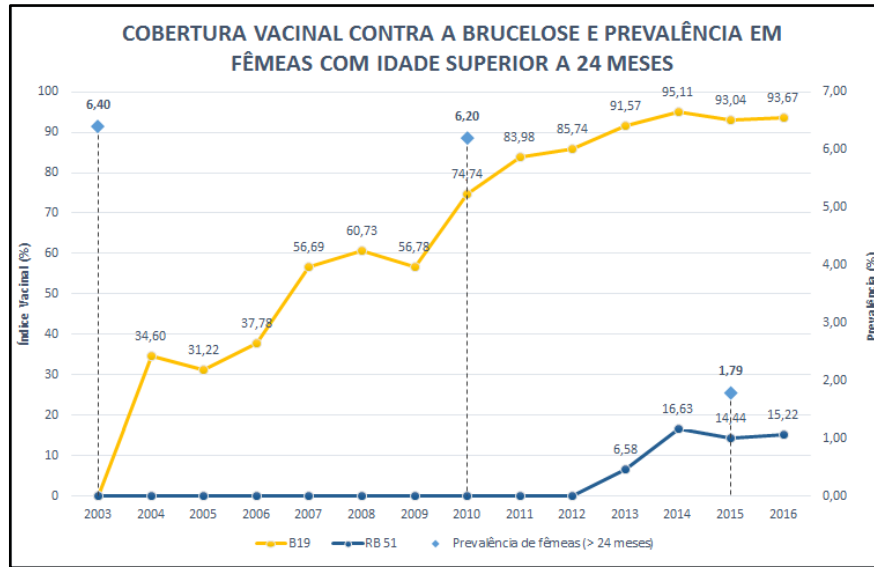
prenhez. Outra causa importante de falha vacinal é a presença de imunidade materna passivamente derivada em animais jovens (TIZARD, 2002).

Segundo Paulin e Ferreira Neto (2003), bezerras vacinadas com a cepa B-19 produzem tanto IgM quanto IgG, sendo a IgM a primeira classe de anticorpos a aparecer após a vacinação por volta do quinto ao sétimo dia, alcançando o nível máximo de produção entre o 13º e o 21º dia após a vacinação, enquanto que a IgG é detectável entre o 14º e 21º dia pós-vacinação, com máxima concentração entre o 28º e 42º dia.

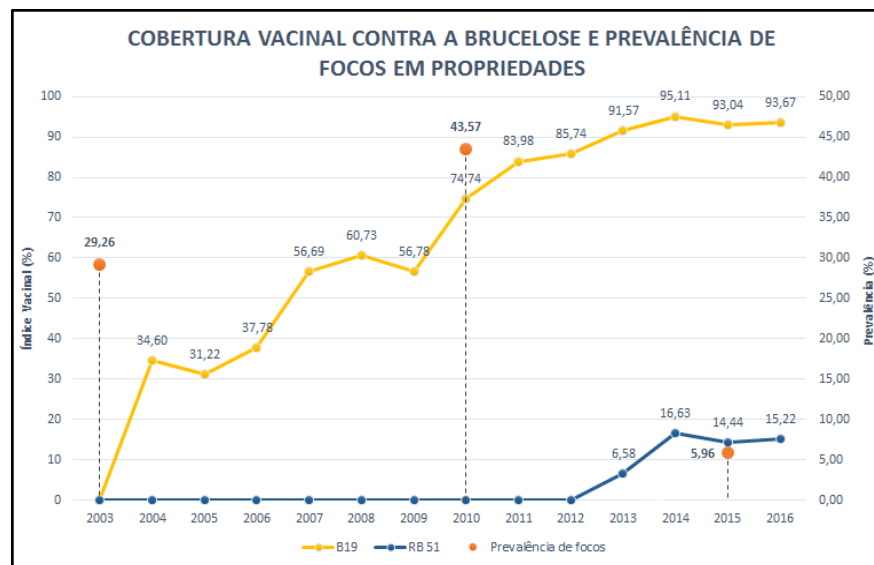
Alguns estudos descrevem a avaliação da resposta imune humoral de bezerras bovinas e bubalinas vacinadas contra brucelose utilizando a cepa B-19. Fêmeas bubalinas vacinadas com dose padrão da cepa B-19 respondem com curvas de anticorpos semelhantes às apresentadas por fêmeas bovinas quando vacinadas na mesma idade. Nesses estudos, os autores descreveram que todas as amostras de soros coletadas imediatamente antes da vacinação eram não reagentes ao teste de AAT e que a partir dos sete, 14 ou 30 dias após a vacinação todas as fêmeas vacinadas apresentaram resultado reagente positivo ao AAT (PEREIRA et al., 2015; POESTER e RECKZIEGEL, 1998; RIBEIRO et al., 1997; SILVA JÚNIOR, 2013).

Desde o lançamento do PNCEBT houve um significativo aumento no número de bezerras vacinadas com a cepa B-19, principalmente a partir de 2004. É importante enfatizar que há uma grande heterogeneidade na qualidade da prática da vacinação entre os estados. Minas Gerais é um bom exemplo de sucesso no combate à brucelose com utilização da vacina B-19, reduzindo a prevalência de 6,57% para 0,81%, entre os anos 1980 e 2012, desde que adotou um programa de vacinação compulsória em 1993, demonstrando o impacto positivo da vacinação na redução da prevalência da brucelose (FERREIRA NETO et al., 2016; PAULIN e FERREIRA NETO, 2003; OLIVEIRA et al., 2016).

No estado do Tocantins o programa compulsório de vacinação contra brucelose foi instituído em 2003, mas o coeficiente de cobertura vacinal acima de 80% utilizando a vacina B-19 ocorreu a partir de 2011 (BARBOSA e OSÓRIO, 2017; ADAPEC/TO; comunicação pessoal). Contudo, as prevalências estimadas na microrregião de Araguaína/TO em fêmeas (>24 meses) e de focos variam de 6,40% [IC 95% (3,92% a 8,89%)] a 6,20% [IC 95% (6,10% a 6,20%)] e de 29,26% [IC 95% (24,26% a 34,66%)] a 43,50% [IC 95% (42,30% a 44,80%)], respectivamente (BAPTISTA et al., 2012; OGATA et al., 2009). Em 2015, as prevalências em fêmeas (>24 meses) e de focos registradas nessa mesma microrregião foram, respectivamente, 1,79 (IC 95% [0,17% a 6,80%]) e 5,56 (IC 95% [3,11% a 11,13%]) (Figuras 3 e 4) (BARBOSA e OSÓRIO, 2017; ADAPEC/TO; comunicação pessoal).



**Figura 3** - Coeficiente de cobertura vacinal nos últimos 13 anos no estado do Tocantins e prevalência da brucelose bovina em fêmeas (>24 meses) na microrregião de Araguaína/TO (Arquivo pessoal).



**Figura 4** - Coeficiente de cobertura vacinal nos últimos 13 anos no estado do Tocantins e prevalência de focos da brucelose bovina na microrregião de Araguaína/TO (Arquivo pessoal).

Segundo Souza et al. (2016), no estudo de modelagem matemática no controle da brucelose bovina com a utilização da vacina RB-51, o tempo médio para reduzir a prevalência da brucelose para menos de 2,0% seria de aproximadamente 12 anos, com cobertura vacinal acima de 80% utilizando a vacina B-19 em bezerras com três a oito meses, associada a cobertura vacinal de 40% utilizando a cepa RB-51 em fêmeas não vacinadas com a cepa B-19.

A vacina indutora de anticorpos não aglutinantes, cepa RB-51, foi elaborada com uma cepa de *B. abortus* rugosa atenuada, originada da cepa lisa virulenta 2308 que sofreu passagens sucessivas em meio contendo concentrações subinibitórias de rifampicina. Ela possui características de proteção semelhantes à cepa B-19, porém, por ser uma cepa rugosa, não induz a formação de anticorpos contra o polissacarídeo-O e não interfere no diagnóstico sorológico da doença (BRASIL, 2006).

A adoção voluntária da vacina RB-51 tem como objetivo aumentar a cobertura vacinal de fêmeas em idade reprodutiva em menor tempo possível, pois com a cepa B-19, devido a restrição na idade de vacinação, esse objetivo somente seria alcançado após um período equivalente à idade média de abate de vacas em reprodução (FERREIRA NETO et al., 2016).

No Brasil, a utilização da vacina cepa B-19 poderá ser substituída pela vacina cepa RB-51 na espécie bovina, excluindo-se da obrigatoriedade da vacinação contra a brucelose os estados classificados como “A”. Também é facultada ao produtor a vacinação de fêmeas bovinas com idade superior a oito meses utilizando a vacina cepa RB-51, sem prejuízo à vacinação obrigatória dessas fêmeas com a cepa B-19 (BRASIL, 2017).

No estado do Tocantins, a Portaria nº 162, de 09 de maio de 2013 torna obrigatória em todo o estado a vacinação contra brucelose, com vacina RB-51, de fêmeas bovinas e bubalinas, com idade acima de oito meses, que não foram vacinadas entre três e oito meses de idade com vacina B-19 (TOCANTINS, 2013).

Após a vacinação as fêmeas deverão ser obrigatoriamente marcadas com ferro candente ou nitrogênio líquido, no lado esquerdo da cara, com o algarismo final do ano de vacinação para aquelas vacinadas com a cepa B-19 e com um “V” para as fêmeas vacinadas com a cepa RB-51 (BRASIL, 2017).

A certificação de estabelecimentos de criação livre de brucelose é outra estratégia do PNCEBT para reduzir a prevalência da brucelose. Para obtenção do certificado de estabelecimento de criação livre de brucelose devem ser cumpridas as seguintes normas: todas as fêmeas, entre três e oito meses de idade, devem ser vacinadas contra brucelose; e realização de dois testes de rebanho negativos consecutivos, com intervalo de seis a 12 meses, sendo o segundo realizado em laboratório oficial. Os testes de diagnóstico para brucelose são obrigatórios para aqueles animais em conformidade com o art. 24, da Instrução Normativa nº 10 do MAPA (BRASIL, 2017).

A ideia central da certificação está na indústria, representada pelos laticínios e frigoríficos, que remunerariam de forma diferenciada o leite e a carne de propriedades certificadas, isso estimularia a adesão do produtor devido aos custos não negligenciáveis do processo, como reportado por estudos econômicos, entretanto, esse incentivo não

aconteceu e os resultados do programa de certificação de propriedades não foi bem sucedido (FERREIRA NETO et al., 2016; LEITE, 2012; LÔBO, 2008).

O controle do trânsito de bovinos e bubalinos também faz parte da estratégia de controle da disseminação da brucelose. A emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA), qualquer que seja a finalidade, fica condicionada à comprovação de vacinação obrigatória contra a brucelose no estabelecimento de criação de origem dos animais, devendo ser vacinadas todas as fêmeas na idade de três a oito meses utilizando a cepa B-19 e aquelas com idade acima dos oito meses devem ser vacinadas com a cepa RB-51. A comprovação da vacinação deve ser realizada pelo proprietário ao SVO, no mínimo, uma vez por semestre (BRASIL, 2017).

Para fins de trânsito interestadual de bovinos e bubalinos destinados à reprodução, é obrigatória a apresentação de resultados negativos aos testes de diagnóstico para brucelose e tuberculose. A emissão da GTA fica condicionada à apresentação do atestado de exame negativo para brucelose e tuberculose emitido por médico veterinário habilitado, o qual deverá permanecer anexado à via da GTA que acompanha os animais (BRASIL, 2017).

Os testes de diagnóstico para brucelose são obrigatórios para aqueles animais em conformidade com o art. 24, da Instrução Normativa nº 10 do MAPA, excetuando-se os animais com origem em estabelecimento de criação certificado como livre de brucelose. (BRASIL, 2017).

Para fins de trânsito interestadual de bovinos e bubalinos com destino a estados classificados como risco muito baixo (A0, A1, A2 e B2) ou risco desprezível (A3) para brucelose e tuberculose é obrigatória a apresentação de resultados negativos aos testes de diagnóstico para brucelose para qualquer finalidade, exceto para abate imediato. Animais oriundos de estados classificados como risco muito baixo ou risco desprezível para brucelose e tuberculose ficam dispensados do exame, exceto para reprodução. Ficam também dispensados dessa obrigatoriedade os animais oriundos de estabelecimento de criação livres de brucelose e tuberculose (BRASIL, 2017).

Na emissão da GTA para bovinos e bubalinos destinados à participação em aglomerações de animais devem estar acompanhados do atestado com resultado negativo para os testes de diagnóstico para brucelose e tuberculose, válido para todo o período de permanência do animal no evento. Excluem-se dos testes os animais procedentes de estabelecimento de criação livre para brucelose e tuberculose (BRASIL, 2017).

O trânsito internacional de animais, sêmen e embriões é regido pelas normas dispostas no Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) ou conforme normas especificadas em acordos internacionais firmados (BRASIL, 2017).

Como forma de padronizar as ações, o PNCEBT prevê a realização de Curso de Treinamento em Métodos de Diagnóstico e Controle da Brucelose e Tuberculose para habilitar médicos veterinários da iniciativa privada a executar determinadas ações previstas no Programa. Além disso, o SVO pode cadastrar também médicos veterinários que atuam no setor privado para executar a vacinação contra a brucelose (BRASIL, 2017).

### 3 OBJETIVOS

Sendo a vacinação de fêmeas bovinas e bubalinas contra brucelose um ponto crítico no âmbito do PNCEBT, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

**Objetivo geral:** Contribuir para a melhoria do processo de controle da brucelose bovina, no âmbito do PNCEBT, nas fases em que a vacinação é a principal medida para a redução da prevalência e incidência da doença nos rebanhos.

**Objetivos específicos:**

- Determinar o coeficiente de soroconversão atribuível à vacinação de bezerras de três a oito meses de idade com a cepa B-19 de *B. abortus*, em sete e 14 dias após a vacinação.
- Determinar e propor, ao nível de confiança de 95%, um coeficiente mínimo de soroconversão, como parâmetro de auditoria da vacinação de bezerras com três a oito meses de idade com a cepa B-19 de *B. abortus*, visando o monitoramento da vacinação contra a brucelose bovina na fase de controle em que essa medida assume um papel preponderante.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins (UFT), sob o processo nº 23101.005895/2016-10.

### 4.2 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

De acordo com a proporção dos rebanhos bovinos de pequeno, médio e grande porte no município de Araguaína/TO e com a disponibilidade de recursos humanos e financeiros, permitindo a realização de um ensaio randomizado envolvendo 100 bezerras com três a oito meses de idade, foram sorteadas aleatoriamente para o estudo cinco propriedades rurais de um total de 916 existentes no município distribuídas da seguinte forma: três propriedades pequenas, uma propriedade média e uma propriedade grande.

A classificação das propriedades selecionadas em pequena, média e grande levou em consideração a área destinada à pecuária bem como o tamanho do rebanho bovino, conforme critério adotado pela Agência de Defesa Agropecuária do Tocantins (Adapec/TO).

Foram incluídas no ensaio randomizado as 38 bezerras procedentes das três propriedades de pequeno porte e, por amostragem aleatória simples, 22 e 50 bezerras pertencentes às propriedades de médio e grande porte, respectivamente. Assim, foi alocada para o estudo uma população amostral (n) de 110 bezerras em idade vacinal contra a brucelose, 10 fêmeas a mais visando compensar eventuais perdas.

### 4.3 RANDOMIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AMOSTRAL

A população amostral (n=110) foi dividida em dois grupos de 55 animais, sendo um intervenção e o outro controle. As bezerras em idade vacinal contra brucelose foram distribuídas nesses grupos de forma aleatória utilizando a técnica de randomização.

O dia zero (D-0) do experimento foi marcado a partir da primeira coleta de sangue imediatamente antes da vacinação das bezerras do grupo intervenção. As coletas de sangue pós-vacinação foram realizadas nos dias 7 (D-7), 14 (D-14) e 21 (D-21) (RIBEIRO et al., 1997; SILVA JÚNIOR, 2013).

Os 55 animais do grupo intervenção receberam uma única dose de 2 ml da vacina contra brucelose, cepa B-19, contendo de 60 a 120 bilhões de unidades formadoras de colônias (UFC), aplicada no espaço subcutâneo na região do pescoço, no primeiro dia do experimento (D-0), enquanto que as 55 bezerras do grupo controle receberam um placebo de 2 ml solução de cloreto de sódio a 0,9%, também aplicada no espaço subcutâneo na região do pescoço.

O ensaio randomizado foi realizado até o 14<sup>o</sup> dia (D-14) após o início do experimento, momento em que as 55 bezerras do grupo controle foram vacinadas com a dose padrão recomendada da cepa B-19 visando cumprir com o que determina a legislação vigente. A coleta de sangue no D-21 permitiu repetir, com as bezerras do grupo controle, a determinação da soroconversão no sétimo dia após a vacinação.

Nesse estudo foram utilizadas vacinas, cepa B-19 de *B. abortus*, de três laboratórios distintos, acondicionadas sob temperatura de refrigeração de 2° a 8°C até o momento da inoculação nas bezerras selecionadas para a pesquisa.

As bezerras amostradas foram marcadas com ferro candente, no lado esquerdo da cara, com um “V”, acompanhado do algarismo final do ano de vacinação, ou seja, “V6”, para as bezerras vacinadas no segundo semestre de 2016 e apenas o algarismo final do ano de vacinação, ou seja, “7”, para as bezerras vacinadas no primeiro semestre de 2017, conforme legislação vigente em cada período (BRASIL, 2009; 2017).

#### 4.4 COLETA DE AMOSTRA SANGUÍNEA

O sangue foi obtido por punção da veia jugular com auxílio de tubos de coleta à vácuo de 10 ml, agulhas descartáveis 25x0.8 e acopladores próprios para o tipo de tubo utilizado. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins, centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos, para obtenção das alíquotas de soro que foram acondicionadas em microtubos (eppendorf) e conservadas à temperatura de -20°C (BRASIL, 2006).

Foi afixado no pavilhão auricular esquerdo das bezerras, com aplicador próprio, um elemento de identificação, com numeração sequencial, para manter a correspondência entre o animal e as amostras de soro sanguíneo obtidas.

#### 4.5 TESTES LABORATORIAIS

Todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), fabricado pelo Instituto Biológico de São Paulo, sob partida nº 001/2017, com validade até 02/2018. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins. A técnica do AAT foi executada conforme preconizado pelo Manual de Legislação para Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil (BRASIL, 2009), descrita resumidamente abaixo:

Os soros dos animais testados e o antígeno contendo *B. abortus* coradas com rosa bengala foram retirados da conservação, permanecendo à temperatura de 22°C + 4°C, por pelo menos 30 minutos. Após esse tempo, o soro foi homogeneizado e dispensado 30 microlitros (µl) com o micropipetador por área da placa de vidro, executando o mesmo

procedimento para o antígeno dispensado ao lado do soro, sem ser nele misturado, sendo processadas 10 amostras por vez. Foram utilizados soros controle positivo e negativo a cada processamento de amostras.

Foi misturado, por meio de misturador simples e com movimentos circulares, o soro e o antígeno de modo a obter um círculo de aproximadamente dois centímetros. Em seguida a placa foi agitada com movimentos oscilatórios durante quatro minutos e a leitura foi realizada colocando a placa na caixa de leitura com luz indireta. Foram consideradas reagentes amostras que apresentaram aglutinação. Os resultados foram anotados e as reações de aglutinação que ocorreram após quatro minutos foram desconsideradas.

#### 4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises estatísticas foram realizadas com recurso do programa de software WinPepi<sup>®</sup> (versão 11.43).

Foi determinado também o coeficiente de soroconversão atribuível à vacinação contra brucelose em bezerras utilizando a cepa B-19 de *B. abortus*, calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Coef. de soroconversão} = I_i - I_c$$

Em que  $I_i$  e  $I_c$  são incidências de soroconversão no grupo intervenção e no grupo controle, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados laboratoriais, com utilização do AAT como teste de diagnóstico no D-0, D-7, D-14 e D-21, foram apresentados de forma sintetizada na Tabela 3.

No D-0, 100% (110/110) (IC 95% [96,70% a 100%]) das bezerras amostradas não apresentaram reação ao teste do AAT (Tabela 3). Esse resultado corrobora com aqueles encontrados por Pereira et al. (2015), Poester e Reckziegel (1998), Ribeiro et al. (1997) e Silva Júnior (2013), mas deve-se considerar a possibilidade da presença de bezerras portadoras latentes descritas por Lemos e Leal (2008) e Paulin e Ferreira Neto (2003), que se constituem em importantes fontes de infecção na fase de erradicação da doença quando a prevalência da brucelose atinge valores próximos a 1,0% (OMS, 1996).

No D-7, 94,55% (52/55) (IC 95% [84,88% a 98,84%]) das bezerras do grupo intervenção apresentaram reação positiva ao teste do AAT (Tabela 3). Ainda no D-7, não se observou bezerras do grupo controle com reação positiva ao teste do AAT, ou seja, quando não se vacina um determinado rebanho de bezerras contra brucelose a probabilidade de encontrar animais reagentes positivos ao AAT tende ser nula (0/55) (IC 95% [0,0% a 6,49%]), entretanto, deve ser considerada a possibilidade de reação positiva nos testes sorológicos até aos quatro meses de idade por anticorpos colostrais ou por exposição ao agente infeccioso, embora segundo Crawford, Huber e Adams (1990); Nicoletti (1980); Samartino e Enright (1993), os animais jovens são mais resistentes à infecção com *B. abortus*.

Considerando-se os intervalos de confiança no D-7 do grupo intervenção [84,88% a 98,86] e do grupo controle [0,00% a 6,49%], por hipótese, a soroconversão atribuível à vacinação com a cepa B-19 de *B. abortus* pode variar entre 78,39% (84,88% - 6,49%) a 92,37% (98,86% - 6,49%). O percentual de 94,55% de resposta vacinal encontrada nesse estudo a partir do D-7 é superior aos dados da literatura que afirmam que a vacina contra brucelose, cepa B-19, confere proteção de 70% a 80% dos animais vacinados.

No D-14, 98,18% (54/55) (IC 95% [90,28% a 99,95%]) das bezerras do grupo intervenção apresentaram reação positiva ao teste do AAT e nesse mesmo dia as bezerras do grupo controle apresentavam ainda resultado reagente negativo ao teste do AAT (0/55) (IC 95% [0,0% a 6,49%]) (Tabela 3). Sendo assim, no D-14 a soroconversão atribuível à vacinação com a cepa B-19 de *B. abortus*, por hipótese, pode variar entre 84,21% (90,28% - 6,49%) e 99,46% (99,95% - 6,49%).

No D-21, 100% (55/55) (IC 95% [93,51% a 100%]) das bezerras do grupo controle vacinadas no D-14 apresentaram soroconversão atribuível à vacinação, ou seja, sete dias após serem vacinadas essas bezerras responderam ao processo de vacinação, sem diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparada à resposta vacinal no grupo intervenção

no D-7, ratificando que a partir do sétimo após a vacinação com a cepa B-19 de *B. abortus* dia já ocorre resposta imunológica detectável ao teste de diagnóstico do AAT (Tabela 3).

**Tabela 3** – Número de bezerras reagentes ao teste de diagnóstico do AAT no D-0, D-7, D-14 e D-21, Tocantins, 2017.

GRUPO	QUANTIDADE	Nº DE BEZERRAS REAGENTES AO TESTE DO AAT							
		D-0	%	D-7	%	D-14*	%	D-21	%
Intervenção	55	0	0	52	94,55	54	98,18	-	-
Controle	55	0	0	0	0	0	0	55	100

(\*) Vacinação das bezerras do grupo controle visando cumprir a IN nº 10, de 03/03/2017.

Para Ferreira Neto et al. (2016), um programa de sanidade animal bem sucedido é dinâmico e muitas vezes deve ser atualizado conforme a evolução da situação epidemiológica e surgimento de novas tecnologias, mas fracassos no combate à doença podem acontecer em decorrência da fragilidade ou dubiedade do programa ou não obediência às regras, entre as quais Paulin e Ferreira Neto (2003) citam a má utilização das vacinas e a fraude de laudos.

No estado do Tocantins o Programa Estadual de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PECEBT) foi implantado em 2003, com vacinação compulsória das bezerras em idade vacinal, entretanto, somente em 2011 atingiu a cobertura vacinal com a cepa B-19 acima dos 80%. Em 2012, o PECEBT foi atualizado mediante a instituição da obrigatoriedade da vacinação com a amostra RB-51 de bezerras com idade acima de oito meses e que não foram vacinadas com a vacina B-19.

No entanto, a reformulação do PECEBT não contemplou medidas sanitárias que objetivasse coibir a má utilização de vacinas bem como a fraude de laudos, uma vez que, Baptista et al. (2012) afirmam que na microrregião da Araguaína/TO a vacinação contra a brucelose não é um fator protetor contra a doença, visto que de acordo com o estado de vacinação das fêmeas (>24 meses), declarado pelos seus proprietários ou gerentes, a prevalência de soropositividade para brucelose foi a mesma em vacas com e sem histórico de vacinação ( $p < 0,05$ ), atribuindo esse resultado à falta de critério na execução e monitoramento do processo de vacinação.

De acordo com os dados da literatura, em 2003, na microrregião de Araguaína/TO a prevalência em fêmeas (>24 meses) foi de 6,40% (IC 95% [3,92% a 8,89%]) e em 2010 essa prevalência que foi de 6,20% (IC 95% [6,10% a 6,20%]), portanto, sem redução significativa em sete anos. Ao contrário, a prevalência de focos da brucelose nessa mesma microrregião aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) de 29,26% (IC 95% [24,26% a 34,66%]) em 2003 para 43,50% (IC 95% [42,3% a 44,48%]) em 2010, apontando para a necessidade de maior controle sobre execução da vacinação de bezerras contra brucelose.

Segundo os dados disponibilizados pela Adapec/TO (BARBOSA e OSÓRIO, 2017; ADAPEC/TO; comunicação pessoal) referente ao levantamento soroepidemiológico da brucelose bovina em 2015 no estado do Tocantins, a prevalência de focos de foi de 6,42% (IC 95% [4,76% a 8,62%]) o que classificaria o estado do Tocantins como risco médio para brucelose conforme critério de risco adotado pelo MAPA, mas quando se avalia os limites superiores dos intervalos de confiança da prevalência de focos em cada microrregião do estado (Tabela 4), observa-se que, estatisticamente, quatro dessas cinco microrregiões ainda podem ser classificadas como risco alto para brucelose segundo o mesmo critério, visto que a prevalência média da brucelose pode ser fortemente influenciada pelos seus valores extremos.

**Tabela 4** - Prevalência de focos da brucelose bovina no estado do Tocantins, Brasil, 2017.

MICRORREGIÃO	PREVALÊNCIA (%)	IC 95% (%)
Central	5,88	3,07 - 10,99
Bico do Papagaio	5,96	3,11 - 11,13
Sul	8,67	5,07 - 14,43
Jalapão	3,31	1,37 - 8,78
Araguaína	5,96	3,11 - 11,13
<b>Total</b>	<b>6,42</b>	<b>4,76 - 8,62</b>

Fonte: Centro de Colaboração em Sanidade Animal da Universidade de São Paulo.

Independentemente da classificação a ser atribuída pelo MAPA ao estado do Tocantins, a medida principal de controle e erradicação da brucelose nessa fase do programa é a vacinação em massa de bezerras com três a oito meses de idade com cobertura vacinal acima de 80%. Sendo assim, de acordo com Paulin e Ferreira Neto (2003), é necessária a estruturação de um sistema de vigilância contra a brucelose que deve ser implementado e gerenciado pelo SVO aplicando métodos de controle de qualidade dos procedimentos da vacinação baseados em auditorias.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2003) na fase de vacinação em massa de bezerras a cepa B-19 de *B. abortus* deve ser adotada como vacina padrão dos programas de combate contra a brucelose. A FAO (2003) recomenda ainda que sejam realizados testes de diagnóstico utilizando o AAT em duas a três semanas após a vacinação em amostragens aleatórias de bezerras vacinadas com a cepa B-19, em que mais de 80% desses animais deverão apresentar anticorpos contra *B. abortus*, visando o monitoramento da cobertura vacinal e da eficiência das estratégias adotadas para o controle e erradicação dessa enfermidade.

Visto que a partir do sétimo dia já ocorre produção de anticorpos da classe IgM e baseando-se na metodologia de monitoramento da vacinação com a cepa B-19 de *B.*

*abortus* recomendada pela FAO (2003) e no coeficiente de soroconversão atribuível à vacinação determinada nesse estudo, considera-se como resposta satisfatória ao processo de vacinação o rebanho que obtiver um coeficiente de soroconversão igual ou superior a 78,39% e 84,21%, respectivamente, no D-7 e D-14.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo permitem recomendar ao SVO que institua auditoria da vacinação, com coleta aleatória de amostras de sangue a partir do sétimo dia em bezerras declaradas como vacinadas com a cepa B-19, utilizando a prova do AAT como teste de diagnóstico e considerando um coeficiente mínimo de soroconversão de 75%, visando o monitoramento do processo de vacinação realizado sob responsabilidade técnica de médicos veterinários cadastrados nos Programas Estaduais de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=6>> Acesso em: 24/08/2016.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y los animales**. Bacteriosis y micosis, Washington: Pan American Health Organization. 3ª ed., v.1, 398 p. 2001.

ADAMS, L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.553-561, 2002.

ALMEIDA, E.C.; FREITAS, A.A.; PONTUAL, K.A.Q.; SOUZA, M.M.A.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O.; HEINEMANN, M.B.; GONÇALVES, V.S.P.; EVÊNCIO NETO, J.; MARVULO, M.F.V.; GRISI-FILHO, J.H.H.; FERREIRA NETO, J.S.; SILVA, J.C.R. Prevalence and associated risk factors for bovine brucellosis in the state of Pernambuco, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3413-3424, 2016.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; ANGUS, R.D.; VERGER, J.M. Techniques for the brucellosis laboratory. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, 188p., 1988.

ALVES, A.J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIENSE, L., AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, suppl.1, p.6-13, 2009.

ALVES, A.J.S.; VILLAR, K.S. Brucelose bovina e sua situação sanitária no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV/SP**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v.9, n.2, p.12-17, 2011.

ANZAI, E.K.; COSTA, D.; SAID, A.L.P.R.; GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; GALVIS, J.O.A.; GONÇALVES, V.S.P.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; FERREIRA NETO, J.S. An update on the epidemiological situation of bovine brucellosis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3437-3448, 2016.

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

BAPTISTA, F.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A.; ALMEIDA, K.S.; NARDI, C.P.P. Prevalence and risk factors for brucellosis in Tocantins and Brazilian national programs to fight this disease. **Revista Patologia Tropical**, v.41, n.3, p.285-294, 2012.

BARDDAL, J.E.I.; SANTOS, J.C.Q.; LOPES, I.F.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; GONÇALVES, V.S.P.; AGUIAR, D.M. Effect of vaccination in lowering the prevalence of bovine brucellosis in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3479-3492, 2016.

BAUMGARTEN, K.D.; VELOSO, F.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; HEINEMANN, M.B.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S.D. Prevalence and risk factors for bovine brucellosis in the State of Santa Catarina, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p. 3425-3436, 2016.

BEER, J. **Doenças Infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, p.163-178. 1999.

BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia básica**. 2ª ed., São Paulo, 213p.: il., 2010.

BORBA, M.R.; STEVENSON, M.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; TELLES, E.O.; SANTANA, S.S.; FERREIRA, J.C.A.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V.C.F.; DIAS, R.A. Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhão State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.110, n.2, p.169-176, 2013.

BRASIL. **Boletim de defesa sanitária animal**. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. Brasília, v.2, n.1/4, 1988.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 19 de fevereiro de 2004. **Regulamento técnico para produção e controle de qualidade da vacina contra brucelose e antígenos para diagnóstico da brucelose e tuberculose animal**. Diário Oficial da União Nº 57, Brasília, 24 de março de 2004, Seção 1, p.25-26, 2004.

BRASIL. **Manual técnico: Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Brasília-DF, 188 p., 2006.

BRASIL. **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. 440p. 2009.

BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 8ª ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 444 p.: il., 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 10, de 03 de março de 2017**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília-DF, 2017.

CALDEIRA, G.A.V. **Avaliação de bactérias viáveis e do ensaio de estabilidade térmica no controle vacinas B-19 contra brucelose comercializadas no Brasil**, 2008. Dissertação (mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2008.

CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e profilaxia da brucelose bovina e bubalina**. Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 20p., 2003.

CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p.196-201, 1991.

CARVALHO NETA, A.V.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **Veterinary Journal**, n.184, p.146-155, 2010.

CAVALLÉRO J.C.M. **Enfermidades causadoras de aborto: brucelose**. In: LEMOS, R.A.A. Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul: reconhecimento e diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. p.536, 1998.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: principles, practice and problems. **Surveillance**, v.16, p.3-6, 1989.

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

CLEMENTINO, I.J.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O.; HEINEMANN, M.B.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; FERREIRA NETO, J.S.; ALVES, C.J.; BEZERRA, C.S.; AZEVEDO, S.S. Epidemiological situation of bovine brucellosis in the state of Paraíba, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3403-3412, 2016.

CORBEL, M.J. **Brucellosis in man and animals**. Geneva: WHO, 89p., 2006.

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

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

DEPARTMENT FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT UK. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. **International Livestock Reserach Institute**, Hanoi School of Public Health, 2012.

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

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

DIAS, R.A.; BELCHIOR, A.P.C.; FERREIRA, R.S.; GONÇALVES, R.C.; AGUIAR, R.S.C.B.; SOUSA, P.R.; SANTOS, A.M.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; TELLES, E.O.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S. Controlling bovine brucellosis in the state of São Paulo, Brazil: results of ten years of vaccination program. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3505-3518, 2016.

EAGLESOME, M.D., GARCIA, M.M. Microbial agents associated with bovine genital tract infection and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **Vet. Bull**, v.62, p.743-775, 1992.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance**. Rome: Animal Production and Health Division FAO Agriculture Department, n.156, p.1-45, 2003.

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

FERREIRA, A. J.; FERREIRA. C. **Doenças infecto-contagiosas dos animais doméstico**. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.125-143. 1990.

FERREIRA NETO, J.S.; SILVEIRA, G.B.; ROSA, B.M.; GONÇALVES, V.S.P.; GRISI-FILHO, J.H.H.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F.; HEINEMANN, M.B.; TELLES, E.O.; LAGE, A.P. Analysis of 15 years of the National Program for the Control and Eradication of Animal

Brucellosis and Tuberculosis, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3385-3402, 2016.

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

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Review in Molecular Medicine**, v.9, n.35, p.1-10, 2007.

GARCIA-CARRÍLLO, C. **La brucellosis de los animales en América y su relación con la infección humana**. Paris: Office International des Epizooties, 299p. 1987.

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

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

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v.90, p.281-297, 2002.

INLAMEA, O.F.; ROCHA, A.B.; FERREIRA, F.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; GONÇALVES, V.S.P.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S. Effect of vaccination in lowering bovine brucellosis in the state of Rondonia, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3493-3506, 2016.

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

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

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

LEAL FILHO, J.M.; BOTTENE, I.F.N.; MONTEIRO, L.A.R.C.; PELLEGRIN, A.O.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; AMAKU, M.; TELLES, E.O.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S. Control of bovine brucellosis from 1998 to 2009 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3467-3478, 2016.

LEITE, B.M. **Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina**. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília (UnB), Brasília-DF, 2012.

LEMOS, R.A.A; LEAL, C.R.B. **Doenças de impacto econômico em bovinos de corte: perguntas e respostas**. Campo Grande/MS, Ed. UFMS, 450p., 2008.

LIRA, N.S.C. **Lesões anatomopatológicas e detecção da *Brucella ovis* cepa REO 198 em ovinos inoculados experimentalmente pelas vias intraprepucial e conjuntival simultaneamente**, 2008. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP - Campus de Botucatu/SP, Botucatu, São Paulo, 2008.

LÔBO, J.R. **Análise custo-benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília (UnB), Brasília-DF, 2008.

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

MATHIAS L.A.; MEIRELLES R.B.; BUCHALA F.G. Estabilidade do antígeno de célula total de *Brucella abortus* para uso no diagnóstico sorológico da brucelose bovina pela reação de fixação de complemento. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.27, n.1, p.18-22, 2007.

MEGID, J.; MARCOS JÚNIOR, G.; RIBEIRO, M.G.; CROSSI, A.J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.37, n.5, São Paulo. 2000.

METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. **Brucellosis**. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. Handbook of zoonoses. 2ª ed. Boca Raton: CRC Press, p.9-39, 1994.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v.155, p.335-50, 1986.

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

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in veterinary science comparative medicine**, v.24, p.69-98, 1980.

NICOLETTI, P. Vaccination. In: **NIELSEN K.; DUNCAN, J.R. Animal brucellosis**. Boca Raton, CRC Press, p.283-299, 1990a.

NICOLETTI, P. Bovine abortion caused by *Brucella sp.* In: **KIRKBRIDE, C.A. Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion**, 3<sup>th</sup> Ed. Ames: Iowa State University Press, p.22-26, 1990b.

NIELSEN, K. Development of live *Brucella* vaccines. In: **ADAMS, L.G. Advances in Brucellosis Research**. College Station, TX: Texas A&M University Press, p.251- 76, 1990.

NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. **Journal of Immunological Methods**, v.195, p.161-168, 1996.

NIELSEN, K.; GALL, D.; LIN, M.; MASSANGILL, C.; SAMARTINO, L.E; PEREZ, B.; COATS, M; HENNAGER, S. DAJER, A; NICOLETTI, P; THOMAS, F. Diagnosis of bovine brucellosis using a homogeneous fluorescence polarization assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.66, p.321-329, 1998.

NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, P; YEO, J.; KENNY, K; HENEGHAN, T.; McNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.E.; DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.21, p.163-70, 2001.

NIELSEN, K.; GALL, D. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: a review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.22, p.183- 201, 2001.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v.100, n.1-2, p.25-30, 2004.

NOVAIS, C.M.; PIRES ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.33, p.10-13, 2004.

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

OIE/WHO. **Brucellosis (*Burcella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)**. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal (adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in may 2016), 7<sup>th</sup> Edition, 2012.

OLIVEIRA, L.F.; DORNELES, E.M.S.; MOTA, A.L.A.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; AMAKU, M.; LAGE, A.P. Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3449-3446, 2016.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Comité mixto FAO/OMS de expertos em brucellosis**. Genebra, OMS, Série de informes técnicos, n.740, 149 p., 1986.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. A Experiência brasileira no combate à brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico em São Paulo**, v.69, n.2, p.105-112, 2002.

PAULIN, L.M.; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXIERA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-Mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.69, p.41-47, 2002.

PAULIN, L.M.; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: situação brasileira**. Jaboticabal - SP: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 154 p., 2003.

PEREIRA, A.P.M.; CASSEB, A.R.; CASSEB, L.M.N.; VALE, W.G.; PEREIRA, W.L.A. Humoral immune response of buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) vaccinated with B-19 strain of *Brucella abortus*. **Archives of Veterinary Science**, v.20, n.1, p.56-61, 2015.

PÉREZ, J.; QUEZADA, M.; LÓPEZ, J.; CASQUET, O.; SIERRA, M.A.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.17-21, 1998.

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



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

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

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P.; ROXO, E.; MOTA, P.M.P.C.; MÜLLER, E.E.; FERREIRA NETO, J.S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do programa nacional de controle e erradicação de brucelose e tuberculose: introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, p.1-5, 2009.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Scientific and Technical Review - OIE**. 2013.

RIBEIRO, M.G.; SPAGO, N.; FAVA, N.; JATTIR JR., J.; MEGID, J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B-19. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.2, p.137-150. 1997.

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; ALMEIDA, C.A.S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.83-92, 2008.

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

RUSSEL, A.D.; KOULIKOVSKII, A.V. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva: WHO, 61p. 1984.

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

SANTOS, R.L.; MARTINS, T.M.; BORGES, Á.M.; PAIXÃO, T.A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.6, p.759-764, 2013.

SCHLAFER, D.H; MILLER, R.B. Female genital system. In: **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, v.3, 5<sup>th</sup> Edit., M.G. Maxie, Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, p.484-489, 2007.

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

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

SEAGRO. Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária do Tocantins. **Pecuária**. Disponível em: <<http://seagro.to.gov.br/agronegocios/pecuaria/>>. Acessado em: 24/08/2016.

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

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

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

SILVA JÚNIOR, R.A. **Avaliação do perfil sorológico e microbiológico de fêmeas da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) vacinadas contra brucelose com a vacina B-19**. 2013, 84 f.: il. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. São Paulo, 2013.

SILVA, N.S.; GROFF, A.C.M.; VIDOR, A.C.M.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; GONÇALVES, V.S.P.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiological situation of brucellosis after implementation of the vaccination program in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3519-3530, 2016.

SOUZA, V.A.F.; FERREIRA NETO, J.S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; TELLES, E.O.; GRISI-FILHO, J.H.H.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA, F. Mathematical modeling of bovine brucellosis control using the RB51 vaccine. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.37, n.5, suppl.2, p.3385-3402, 2016.

THOEN, C.O.; ENRIGHT, F.; CHEVILLE, N.F. *Brucella*. In: **GYLES, C.L., THOEN, C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2ª ed. Ames: Iowa State University Press, p.236-247,1993.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo, Ed. Roca, 6ª ed., 2002.

TOCANTINS. **Portaria 162, de 09 de maio de 2013**. Programa estadual de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal. Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Tocantins. 2013.

VEJARANO RUIBAL, M.D.P. **Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.

VERONESI, R; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, v.2. p.249. 1996.

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

XAVIER, M.N. **Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; POESTER, F.P.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal Comparative Pathology**, v.140, p.149-157, 2009a.

XAVIER, M.N.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, LIMA, R. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, v.39, n.7, 2009b.

YOUNG, E.J. An overview of human brucellosis. **Clinical. Infectious Diseases**, n.21, p.283-289. 1995.