

Brucelose bovina: uma atualização

Bovine brucellosis: an updated review

Andrey P. Lage^{1,4}, Fernando P. Poester¹, Tatiane A. Paixão¹, Teane M. A. Silva¹, Mariana N. Xavier¹,
Sílvia Minharro^{1,2}, Karina L. Miranda¹, Cristiane M. Alves^{1,3}, Juliana P. S. Mol¹, Renato L. Santos¹

¹Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, TO, Brasil.

³Serviço de Sanidade Agropecuária, Superintendência Federal de Agricultura em Minas Gerais, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Belo Horizonte, MG, Brasil

⁴Email: alage@vet.ufmg.br; Fax: (31) 49 09 20 80

Resumo

Esta publicação faz uma revisão atualizada sobre brucelose bovina. São abordados a situação epidemiológica no Brasil, a resistência do microrganismo, os mecanismos de transmissão, os fatores de risco, a patogenia, os sinais clínicos e lesões, o diagnóstico bacteriológico e sorológico, as vacinas, o controle, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) e o aspecto zoonótico da doença.

Palavras-chave: brucelose bovina, diagnóstico, vacinas, controle, PNCEBT, zoonose.

Abstract

An updated review of bovine brucellosis is presented emphasizing the epidemiology of the disease in Brazil, resistance of the microorganism, mechanisms of transmission, risk factors, pathogenesis, clinical signs and lesions, bacteriological and serological diagnosis, vaccines, control, the National Program on the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis (PNCEBT) and the zoonotic aspects of the disease.

Keywords: bovine brucellosis, diagnosis, vaccines, control, PNCEBT, zoonosis.

Introdução

A brucelose bovina é uma doença infecciosa crônica que atinge os bovinos e se manifesta principalmente por abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos além de ser uma zoonose de grande importância (Thoen *et al.*, 1993; Acha e Szyfres, 2003). A doença é causada pela *Brucella abortus*. Outras espécies de *Brucella* como *B. suis* e *B. melitensis* também podem causar brucelose nos bovinos quando estes estão em contato com suínos, cabras e ovinos, que são, respectivamente, os portadores naturais daqueles agentes (Acha e Szyfres, 2003, Bovine..., 2008). Vale ressaltar que *B. melitensis* é exótica no Brasil (Poester *et al.*, 2002; Manual..., 2006).

As perdas advindas da infecção por *B. abortus* estão relacionadas à baixa eficiência reprodutiva dos animais, com conseqüente diminuição da produção do rebanho. A ocorrência de abortos acarreta um aumento do intervalo entre partos que leva à diminuição da produção de leite. Associados aos abortos, a alta frequência de natimortos e bezerros nascidos fracos, que geralmente morrem ou têm seu crescimento prejudicado, reduz o número de bezerros disponíveis para comercialização. Estima-se que a diminuição da produção de carne e leite seja da ordem de 25% e que o decréscimo da produção de bezerros seja da ordem de 15% (Bernués *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2008). Outras perdas importantes, mas de difícil quantificação, são a depreciação do preço dos animais oriundos de propriedades com brucelose e os gastos relativos ao tratamento e à redução da atividade produtiva de pessoas infectadas.

Epidemiologia

Situação no Brasil

A brucelose bovina é uma doença endêmica no Brasil, tendo sido diagnosticada em todos os estados da Federação; contudo existem marcadas diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os estados. Em estudo sorológico realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975, foi observada prevalência de 4,0% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,0% na região Nordeste e 4,1% na região Norte (Anselmo e Pavez, 1977; Poester *et al.*, 2002). Vários outros estudos, realizados nas décadas de 1980 e

1990 em diferentes estados ou em regiões dentro dos estados, mostraram resultados de prevalência semelhantes aos estimados em 1975 (Castro, 1982; Manual..., 2006).

No começo da década de 1990, o Estado de Minas Gerais iniciou uma campanha de vacinação obrigatória de bezerras com a vacina B19 em todo o estado. Além de Minas Gerais, o único estado que possuía um programa de vacinação, apesar de haver diminuído os índices de cobertura vacinal nos últimos anos, era o Estado do Rio Grande do Sul (Paulin e Ferreira Neto, 2003).

Em 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) que definiu estratégias para o controle da brucelose bovina no Brasil (Instrução ..., 2004).

Inquéritos soropidemiológicos realizados no período de 2001 a 2004 em 13 unidades federativas (BA, ES, GO, MG, MT, PR, SC, RJ, RS, SP, SE, TO e DF) mostraram que a doença está disseminada em todas as áreas estudadas e que a situação é heterogênea entre Estados e mesmo entre regiões de um mesmo Estado. Evidenciou-se uma tendência de crescimento da prevalência no sentido Centro-Oeste/Norte do país, com prevalências mais elevadas especialmente naqueles estados tradicionais produtores de carne (Situação ..., 2006). Alguns Estados, como o Mato Grosso, apresentaram aumento da prevalência quando comparado aos dados do último diagnóstico de situação em nível nacional, realizado em 1975 (Anselmo e Pavez, 1977). Fato relevante é a diminuição significativa da prevalência da doença em alguns estados como Minas Gerais, proporcionada pela campanha de vacinação das fêmeas bovinas e bubalinas com vacina B19 iniciada em 1993 (Castro, 1982; Paulin e Ferreira Neto, 2003, Manual ..., 2006). Confirmou-se a baixa prevalência da doença em Santa Catarina, o que possibilita ao estado implementar estratégias de erradicação da brucelose (Situação ..., 2006).

Resistência de Brucella abortus

As bactérias do gênero *Brucella* são muito resistentes aos fatores ambientais. *B. abortus* pode permanecer por longos períodos (seis meses ou mais) em material de aborto ou parto nas pastagens. A permanência destas bactérias no ambiente aumenta em determinadas condições como a presença de sombra, umidade e baixas temperaturas. Portanto, é recomendado que se procure deixar os locais com altas taxas de contaminação expostos ao sol, que é um potente germicida (Wray, 1975; Brasil, 2006a). *B. abortus* é sensível à pasteurização e aos desinfetantes como cal, cloro, cresol, fenol e formol, em concentrações ideais, que devem ser utilizados na desinfecção de instalações, utensílios e ambiente (Russel *et al.*, 1984; Manual ... , 2006).

Mecanismos de transmissão

A principal via de infecção de *B. abortus* no bovino é a oral, sendo também muito importante a via aerógena (Crawford *et al.*, 1990; Acha e Szyfres, 2003). Uma enorme quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o aborto e parto de animais infectados. Estes animais continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias. Esta enorme quantidade de bactérias eliminadas durante o aborto ou parto dos animais infectados, associada à grande resistência de *B. abortus* no ambiente, é a principal fonte de infecção para os animais susceptíveis (Crawford *et al.*, 1990). Hábitos dos bovinos como lambar e cheirar animais recém-nascidos, ou mesmo fetos abortados, principalmente por outras vacas, favorecem a transmissão da brucelose (Nicoletti, 1980; Crawford *et al.*, 1990).

A participação dos touros na transmissão da brucelose pela monta natural é pequena, pois a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção (Campero, 1993). Entretanto, na inseminação artificial, sêmen contaminado por *B. abortus* é altamente infeccioso por ser depositado diretamente no útero, onde não existem estas barreiras inespecíficas (Crawford *et al.* 1990; Campero, 1993). Por outro lado, a transferência de embriões, desde que realizada conforme recomendações internacionais para lavagens, é uma técnica segura para o controle de brucelose e já foi empregada para aproveitamento de vacas de alta linhagem com sucesso (Stringfellow e Seidel, 1999).

Fatores de risco

Um dos principais fatores de risco para a introdução da brucelose em um rebanho livre é a aquisição de animais. O aumento da frequência de aquisição associado à não exigência de atestado negativo para brucelose dos animais adquiridos favorecem a introdução da doença (Crawford *et al.*, 1990; Lage *et al.*, 2005). Assim, deve-se adquirir animais de propriedades livres de brucelose, pois, quando esses são adquiridos de propriedades que tenham animais com a doença, mesmo que sejam negativos sorologicamente, há o risco de estarem em período de incubação (Lage *et al.*, 2005).

Outros fatores, como a ausência ou baixa taxa de vacinação, o grande tamanho e alta densidade de alguns rebanhos e a demora na eliminação dos animais infectados, propiciam a maior transmissão da brucelose dentro dos rebanhos (Nicoletti, 1980; Crawford *et al.*, 1990; Paulin e Ferreira Neto, 2003; Lage *et al.*, 2005).

Patogenia

A infecção por *B. abortus* se dá pelo contato do agente com qualquer mucosa do animal susceptível, principalmente a mucosa oral (Thoen *et al.*, 1993). Após a penetração no organismo, há um curto período de bacteremia, e as bactérias vão se alojar em diversos órgãos, principalmente do sistema linfático (Eaglesome e Garcia, 1992; Thoen *et al.*, 1993). A capacidade de sobreviver dentro de macrófagos facilita a disseminação e a permanência da *B. abortus* no organismo (Gorvel e Moreno, 2002).

O curso da doença vai depender do estágio fisiológico do animal. Animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção. Caso o animal não esteja gestante, *B. abortus* geralmente infecta linfonodos e glândula mamária (Nicoletti, 1980; Crawford *et al.*, 1990). Quando o animal se torna gestante, as bactérias atingem o útero, local pelo qual possuem grande tropismo, provocando, dessa forma, o aborto (Samartino e Enright, 1993).

Na primeira gestação após a infecção, o animal aborta; entretanto, o aborto é muito menos frequente na segunda gestação após infecção e muito raro a partir da terceira gestação após a infecção (Thoen *et al.*, 1993; Corbel *et al.*, 2006). Isso se deve ao desenvolvimento de uma resposta imune, principalmente celular, pelos animais, que diminui a área e a intensidade das lesões. Com isso, a manifestação clínica passa a ser a presença de natimortos ou o nascimento de bezerras fracas (Nicoletti, 1990a; Thoen *et al.*, 1993).

Sinais clínicos e lesões

Os principais sinais clínicos observados nos animais infectados estão ligados a problemas reprodutivos (Silva *et al.*, 2005). O mais frequente é o aborto no terço final da gestação, natimortos e nascimento de bezerras fracas. Frequentemente, há retenção placentária e infertilidade temporária ou permanente (Eaglesome e Garcia, 1992; Thoen *et al.*, 1993). Nos machos, a infecção por *B. abortus* pode causar orquite com consequente infertilidade por diminuição da qualidade espermática (Campero, 1993).

Lesões articulares, assim como lesões na glândula mamária também podem ser observadas em casos crônicos da doença. As lesões articulares caracterizam-se por bursite e artrite. Placentite necrótica é a principal lesão encontrada nos animais que abortam (Thoen *et al.*, 1993; Xavier *et al.*, 2009). 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 (Nicoletti, 1990a; Xavier *et al.*, 2009).

Diagnóstico

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos isoladamente ou em conjunto. Entre eles destacam-se o diagnóstico clínico, baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerras fracas e esterilidade de fêmeas e machos; dados epidemiológicos baseados na história dos rebanhos; isolamento e identificação do agente etiológico e ainda pela demonstração de anticorpos nos fluidos orgânicos (Olascoaga, 1976; Poester *et al.*, 2005; Bovine ..., 2008).

As observações clínicas e epidemiológicas proporcionam apenas uma indicação da provável presença da enfermidade num rebanho, o que deve ser confirmado pela identificação da bactéria que é o método mais seguro de diagnóstico. No entanto, a identificação da *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de placentas contaminadas, exsudatos vaginais, sêmen, tecidos de fetos abortados ou leite contaminado (Alton *et al.*, 1988; Corbel *et al.*, 2006), que exige a observação de normas estritas de biossegurança (Chosewood e Wilson, 2007). Apesar disto, a identificação e a caracterização das espécies e biovariedades de *Brucella* sp. presentes num rebanho ou região, são importantes do ponto de vista da epidemiologia da doença (Eaglesome e Garcia, 1992; Le Flèche *et al.*, 2006; Bovine ..., 2008).

A detecção de anticorpos no soro ou leite é o meio mais rápido, barato e menos laborioso de diagnóstico e é um indicativo confiável de resposta à exposição a *B. abortus* (Olascoaga, 1976; Nielsen, 2002, Poester *et al.*, 2005).

Diagnóstico bacteriológico

A maioria dos materiais coletados a campo está potencialmente contaminada com microrganismos secundários. Deste modo, é importante que se empreguem meios de cultura seletivos, contendo diversos antibióticos que inibam esta microbiota secundária sem afetar o crescimento de *Brucella* sp. Os materiais de eleição para a tentativa de isolamento de *Brucella* sp. são: membranas fetais, feto abortado, leite, swabs vaginais e sêmen (Alton *et al.*, 1988; Crawford *et al.*, 1990, Poester *et al.*, 2006). O material coletado pode ser enviado congelado (-20°C) ao laboratório desde que mantenha a temperatura durante o transporte.

No caso de material proveniente de tecidos que não sejam oriundos de aborto, em função do pequeno número de bactérias viáveis, o diagnóstico pode resultar em falso-negativo. Nestes casos, torna-se indicado o uso

de meio de enriquecimento suplementado como forma de melhorar a sensibilidade da técnica (Bovine ..., 2008). O enriquecimento com caldo triptose suplementado com a mistura de antibióticos de Farrell proporciona um aumento na taxa de isolamento de *B. abortus* de amostras contaminadas na ordem de 50%, mostrando-se uma ferramenta eficiente no diagnóstico da brucelose bovina (Minharro *et al.*, 2008; Escola de Veterinária da UFMG; informação pessoal).

Um aspecto importante a ser observado durante a coleta de material, o processamento laboratorial e a manipulação de culturas é que *Brucella* sp. é um microrganismo classificado como nível 3 de biossegurança, o que requer que, em toda manipulação de material suspeito de contaminação ou de culturas, sejam utilizados equipamentos de proteção individual – luvas, máscara, óculos, gorro e aventais de mangas longas – e, no laboratório, equipamentos de proteção coletiva – fluxo laminar, sala com pressão negativa, etc (Chosewood e Wilson, 2007).

As membranas fetais são ricas em bactérias, especialmente os cotilédones, onde estão presentes bilhões de *B. abortus* por grama de tecido. O feto abortado pode ser enviado inteiro ao laboratório ou então o seu conteúdo estomacal, pulmão, linfonodo bronquial, baço e fígado, acompanhados do histórico do animal e dos achados de necropsia (Crawford *et al.*, 1990; Poester *et al.*, 2005). No laboratório, o material enviado é então macerado antes de ser semeado em meio de cultura apropriado (Alton *et al.*, 1988).

O leite deve ser coletado o mais assepticamente possível, e a amostra deve conter a mistura dos quatro quartos, aproximadamente 20 ml de cada teto (Poester *et al.*, 2005). Por meio de *swabs* vaginais contendo meio de transporte é possível isolar *Brucella* sp. até seis semanas após o aborto ou parto. O sêmen e o fluido seminal podem ser semeados diretamente nos meios de cultura seletivos (Alton *et al.*, 1988).

Após a identificação de uma cultura como pertencendo ao gênero *Brucella*, é importante o seu envio, seguindo as normas de biossegurança preconizadas para o transporte de agentes infecciosos (Transport ..., 2004), a um laboratório de referência para a sua classificação em espécie e biovariedade (Alton *et al.*, 1988) e tipagem molecular (Le Flèche *et al.*, 2006).

Diagnóstico sorológico

Testes sorológicos baseiam-se na reação entre antígenos de *Brucella* sp., células inteiras inativadas ou suas frações purificadas, e anticorpos produzidos em resposta a uma infecção. Anticorpos produzidos por espécies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) reagem cruzadamente com antígenos preparados com amostras lisas, geralmente *B. abortus*, e anticorpos produzidos por espécies rugosas de *Brucella* (*B. ovis* e *B. canis*) reagem cruzadamente com antígenos produzidos com amostras rugosas, geralmente *B. ovis* (Alton *et al.*, 1988; Nielsen, 2002; Poester *et al.*, 2005).

O principal antígeno envolvido em ambos os casos é o lipopolissacarídeo constituinte da parede celular de *Brucella* sp. Vacinas preparadas com amostras lisas, como a B19, estimulam anticorpos que confundem o diagnóstico nas provas sorológicas de rotina quando aplicadas em fêmeas acima de oito meses de idade. Quando a vacinação é realizada com a vacina B19 em fêmeas entre três e oito meses de idade, as imunoglobulinas da classe IgM aparecem no soro em torno do 5º dia e as imunoglobulinas da classe IgG aparecem quase simultaneamente ou poucos dias depois. O valor máximo de IgM é alcançado em torno do 14º dia e depois desaparecem. As IgG atingem o valor máximo entre 28-42 dias e depois desaparecem (Nielsen *et al.*, 1996). Quanto mais avançada é a idade do animal no momento da vacinação, tanto mais prolongado será o período de desaparecimento dos anticorpos (Olascoaga, 1976; Nielsen, 2002).

Vacinações de animais adultos com B19 favorecem a permanência de anticorpos por períodos prolongados, dificultando a interpretação dos resultados sorológicos (Poester *et al.*, 2005; Manual ..., 2006). Após a infecção com amostras de campo, as mesmas classes de imunoglobulinas também são detectadas, mas em contraste com o que ocorre com os animais vacinados, as IgM declinam rapidamente, e as IgG permanecem em níveis altos (Olascoaga, 1976; Nielsen *et al.*, 1996; Nielsen 2002). Em decorrência da interferência vacinal no diagnóstico sorológico e da possibilidade de abortos em fêmeas gestantes, a vacinação de animais adultos com B19 está proibida no Brasil (Instrução ..., 2004).

Baseado na dinâmica de formação de imunoglobulinas, é que foram desenvolvidas e aprimoradas as diversas provas sorológicas disponíveis. A soroaglutinação tem sido, desde longa data, o principal teste empregado no diagnóstico da brucelose (Técnicas ..., 1968, Olascoaga, 1976; Nielsen, 2002; Poester *et al.*, 2005). Este teste, no entanto, apresenta deficiências seja em sensibilidade, seja em especificidade, especialmente em animais que foram vacinados com vacinas elaboradas com amostras lisas (Bovine ..., 2008). Em alguns casos, a baixa especificidade desta prova é resultante da reatividade cruzada com outras bactérias antígenicamente relacionadas com *Brucella* sp., principalmente *Yersinia enterocolitica* do grupo O9 (Olascoaga, 1976; Nielsen, 2002; Bovine ..., 2008).

Provas com antígenos acidificados tamponados (rosa de bengala, Card-Test[®]) têm sido bastante utilizadas como teste de triagem. São provas muito úteis, mas tendem a ser demasiadamente sensíveis, especialmente em animais vacinados com B19, apresentando altas taxas de animais falso-positivos. Animais reagentes nestas provas devem ser confirmados em outros testes (Olascoaga, 1976; Pruebas ..., 1982; Poester *et*

al., 2005; Manual ..., 2006; Bovine ..., 2008).

Dentre as provas confirmatórias, a fixação do complemento tem sido considerada como uma das provas que apresenta a melhor sensibilidade e especificidade, sendo por isso considerada como prova definitiva. No entanto, apresenta alguns inconvenientes como o fato de não estar padronizada e, por sua complexidade de execução, estar restrita a laboratórios especializados (Olascoaga, 1976; Nielsen, 2002; Brasil, 2004; Bovine ..., 2008). Em função disto, provas menos sofisticadas e com resultados similares têm sido usadas como provas confirmatórias e em alguns casos até em substituição à fixação do complemento. Entre elas destaca-se o teste do 2-mercaptoetanol (2ME), recomendado no PNCEBT como prova confirmatória aos testes de triagem (Poester *et al.*, 2005; Manual ..., 2006). Esta prova apresenta seletividade para imunoglobulinas da classe IgG, pois, em função dos radicais tiol do 2-mercaptoetanol, as IgM são destruídas. Por não serem tão afetadas pelo 2-mercaptoetanol e por serem as imunoglobulinas presentes em infecções crônicas, as IgG presentes em um soro significam infecção por *B. abortus* (Olascoaga, 1976, Poester *et al.*, 2005).

Outra prova de grande utilidade é o teste do anel em leite. Originalmente desenvolvido para testar mistura de leites em latões, ainda é bastante utilizado na detecção de rebanhos infectados (Olascoaga, 1976; Poester *et al.*, 2005). Esse teste tem sofrido modificações para poder ser empregado em leites muito diluídos como no caso de tanques de grandes capacidades. É utilizado, especialmente, no monitoramento e na detecção de rebanhos infectados, desde que algumas limitações, como a possibilidade do aparecimento de resultados falso-positivos no caso de leites levemente ácidos, provenientes de vacas com mamites ou colostro, sejam observadas (Nielsen, 2002; Manual ..., 2006; Bovine ..., 2008).

Mais recentemente, novas provas sorológicas têm sido desenvolvidas. Testes imunoenzimáticos do tipo ELISA de competição que detectam anticorpos no soro, no sangue total e no leite têm demonstrado ser de grande valor diagnóstico, pois apresentam sensibilidade e especificidade altas (Nielsen *et al.*, 1996; Nielsen, 2002; Poester *et al.*, 2005; Bovine ..., 2008).

Outro teste de alta especificidade e sensibilidade desenvolvido é o teste da polarização fluorescente. Para a realização deste teste, necessita-se de um equipamento de luz polarizada e de reagentes compatíveis. A grande vantagem desta prova é que ela pode ser realizada a campo, e o resultado pode ser obtido em dois minutos (Nielsen, 2002; Poester *et al.*, 2005; Bovine ..., 2008).

Tanto os testes de ensaios imunoenzimáticos como os de polarização fluorescente já foram validados em vários países e por isto têm sido recomendados para aplicação em programas de controle e erradicação da brucelose pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE; Bovine ..., 2008). No Brasil, o ensaio de polarização fluorescente foi validado (Lobo, 2008; Divisão de Brucelose e Tuberculose, DAS/MAPA; informação pessoal) e sua utilização no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) está sendo analisada pelo MAPA.

Vacinas contra brucelose

Um programa de controle e erradicação da brucelose bovina deve estar fundamentado em práticas que envolvam a identificação e a eliminação dos animais infectados com a devida indenização dos proprietários para reposição dos animais eliminados. Um programa neste sentido apresenta enormes restrições em sua implantação, especialmente nos países em desenvolvimento, por envolverem recursos humanos e financeiros nem sempre disponíveis. Em consequência disto, a prevenção da doença pela vacinação dos animais suscetíveis assume um papel relevante.

A maioria das pesquisas desenvolvidas na prevenção da brucelose concorda que a resistência a esta doença é primariamente mediada por células e que o papel dos anticorpos ainda não está devidamente esclarecido; portanto, a resistência pós-vacinação não pode ser avaliada pela quantidade de anticorpos presentes no soro como resultado da vacinação, mas pela resposta imune celular induzida pela aplicação de vacina elaborada com bactérias vivas (Baldwin e Parent, 2002; Wyckoff III, 2002).

Ao longo da história, muitas vacinas têm sido desenvolvidas para prevenir a brucelose; algumas elaboradas com amostras vivas, outras com amostras mortas. No entanto, vacinas elaboradas com amostras vivas têm demonstrado ser mais eficazes em induzir imunidade (Schurig *et al.*, 2002). A única vacina morta usada em bovinos e que teve alguma aplicação no passado foi a vacina 45/20, elaborada com uma amostra rugosa, portanto não aglutinogênica, combinada com um adjuvante oleoso. Esta vacina teve seu uso descontinuado em função da pouca proteção conferida, pelas graves lesões locais provocadas pelo adjuvante e pela interferência no diagnóstico sorológico (Alton, 1978; Schurig *et al.*, 2002).

B19

Dentre as vacinas vivas mais usadas, a vacina B19 foi e ainda continua sendo largamente empregada em programas de controle em vários países. Esta amostra foi descrita em 1930, tendo sido isolada originalmente em 1923 a partir do leite de uma vaca infértil. Após ter ficado em meio de cultura à temperatura ambiente por um ano, a B19 demonstrou ter sofrido mutações que conduziram à sua atenuação permanente (Jones e Hooper,

1976).

A vacina B19 apresenta várias características que são altamente desejáveis em uma vacina contra a brucelose, tais como: uma única vacinação em bezerras entre três e oito meses de idade confere imunidade prolongada; previne o aborto; por ser altamente atenuada para bovinos, causa reações mínimas após a sua aplicação e confere proteção em 70-80% dos animais vacinados (Jones e Hooper, 1976; Nicoletti, 1980).

A idade indicada para a vacinação, entre três e oito meses, visa não interferir na imunidade passiva (três meses) e a minimizar reações vacinais e proteger as bezerras antes de entrarem em puberdade (oito meses). Para animais mais precoces, que entram em puberdade mais cedo, a recomendação é que sejam vacinados até os seis meses de idade (Schurig *et al.*, 2002; Bovine ..., 2008).

A resistência de rebanho conferida pela vacina B19, embora não sendo absoluta, reduz enormemente a severidade dos sintomas clínicos, diminuindo a quantidade de organismos patogênicos que são eliminados no ambiente pelos animais infectados. Entretanto, a B19 não tem efeito curativo, não alterando, portanto, o curso da doença quando aplicada em animais infectados (Jones e Hooper, 1976; Nicoletti, 1980).

Apesar destas vantagens, esta vacina apresenta alguns inconvenientes como a indução de anticorpos que confundem o diagnóstico em provas de rotina. Este fato, no entanto, é superado pela restrição da idade de vacinação das fêmeas até os oito meses. Neste caso, os anticorpos desaparecem da circulação sanguínea da maioria dos animais até 12 meses pós-vacinação (Manthei, 1968), ou seja, antes de estes atingirem os 24 meses, idade a partir da qual é necessária a realização de testes diagnósticos segundo o PNCEBT (Manual ..., 2006a). Além disso, animais em gestação não devem ser vacinados, pois poderão abortar (Nicoletti, 1990). Machos também não devem ser vacinados, pois poderão desenvolver orquites e artrites (Campero, 1993; Schurig *et al.*, 2002).

A amostra B19 é patogênica para o homem, havendo inúmeros relatos na literatura de infecções acidentais, especialmente entre veterinários e vacinadores. Em função disso, é importante a utilização de material de proteção individual, máscara, óculos, luvas e avental de manga longa, e seringa descartável durante a vacinação. Após a utilização, é necessário fazer o descarte correto dos frascos e seringas utilizadas (Jones e Hooper, 1976; Manual ..., 2006; Corbel *et al.*, 2006).

RB51

O lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de *Brucella* spp. está diretamente relacionado com a morfologia colonial das amostras. No geral, as colônias são morfologicamente classificadas como lisas e rugosas. Colônias lisas podem se tornar espontaneamente rugosas e amostras rugosas de *Brucella* spp. originalmente lisas, podem reverter à forma lisa (Alton *et al.*, 1988). Segundo alguns estudos, estas mudanças são mediadas pela modulação ou deleção de genes responsáveis pela síntese da cadeia O ou outros genes responsáveis pela biosíntese do LPS (Gorvel e Moreno, 2002; Oliveira *et al.*, 2002).

Normalmente a mudança na morfologia de lisa para rugosa está relacionada com diminuição na virulência da amostra e isto tem sido usado com sucesso na elaboração de vacinas. As colônias de *Brucella* spp. lisas apresentam o LPS constituído fundamentalmente por um polissacarídeo (cadeia O), composto por um homopolímero da perosamina (N, formil-4-amino,4,6-dideoximanose), enquanto as colônias de *Brucella* spp. rugosas apresentam esta cadeia O de maneira deficiente ou até mesmo ausente (Gorvel e Moreno, 2002).

Por ser a fração antigênica mais imunodominante, a cadeia O é a responsável pela resposta de anticorpos na maioria dos animais expostos a *Brucella* spp. lisas. Como a maioria dos testes sorológicos é baseada na detecção de anticorpos contra a cadeia O, vacinas elaboradas com amostras lisas, como a B19, são responsáveis pela produção de anticorpos que não podem ser distinguidos dos anticorpos induzidos pela infecção por *B. abortus* selvagem (Stevens *et al.*, 1995; Schurig *et al.*, 2002).

A necessidade de se obter uma amostra vacinal que eliminasse o principal inconveniente da B19, que é o de induzir a produção de anticorpos que interferem no imunoadiagnóstico, fez com que muitos pesquisadores procurassem alternativas que pudessem superar esta dificuldade. A estratégia foi a de buscar uma mutante rugosa que fosse isenta da cadeia O, estável e suficientemente atenuada, a ponto de permitir a multiplicação nos animais, logo, capaz de induzir uma sólida imunidade do tipo celular (CMI) sem provocar infecção persistente. Uma amostra com estas características foi obtida por diversas passagens de *B. abortus* 2308, originalmente lisa e patogênica, em meios seletivos contendo subdoses de rifampicina. A amostra resultante foi denominada RB51, sendo "R" relativo a rugosa, "B" relativo a *Brucella* e "51" relativo a numeração interna do laboratório (Schurig *et al.*, 1991). Esta amostra é isenta de cadeia O, logo, não induz à formação de anticorpos que interferem nas provas sorológicas de rotina, independentemente da dose, idade e frequência de administração (Eaglesome e Garcia, 1992; Schurig *et al.*, 2002; Poester *et al.*, 2006).

Apesar dos poucos casos de abortos relatados quando da aplicação desta vacina, não se recomenda a vacinação de fêmeas prenhes (Poester *et al.*, 2006; Instrução ..., 2007). Machos também não devem ser vacinados com esta amostra pela possibilidade de causar orquite nos animais vacinados (Instrução ..., 2007).

Estudos sobre a segurança de utilização da RB51 em bovinos demonstraram que a RB51 não é eliminada no ambiente e que não permanece no organismo dos animais por período superior a 12 semanas. No

entanto, medidas de segurança devem ser tomadas no manuseio da vacina, pois a RB51 também é patogênica para o homem (Ashford *et al.*, 2004). As recomendações de segurança na aplicação e descarte da vacina B19 também se aplicam à RB51 (Stevens *et al.*, 1995; Schurig *et al.*, 2002; Manual ..., 2006).

Ensaio experimentais em bovinos mostram que a vacina RB51 apresenta altos níveis de proteção, semelhantes aos da B19, frente a um desafio com amostras selvagens de *B. abortus* (Schurig *et al.*, 2002; Poester *et al.*; 2006). Além disso, apresenta a vantagem de não interferir no diagnóstico sorológico de rotina da brucelose, e de poder ser aplicada em fêmeas não gestantes de qualquer idade e possibilitar a revacinação (Stevens *et al.*, 1995, 1997; Technical ..., 1999; Schurig *et al.*, 2002; Poester *et al.* 2006).

No Brasil, estudo de vacinação de novilhas adultas com RB51 e posterior desafio experimental durante o 6^o-7^o mês de gestação, com amostra virulenta de *B. abortus*, demonstrou que a vacinação diminuiu significativamente a taxa de aborto em relação ao grupo controle. Este grupo apresentou um risco 2,5 maior de os animais abortarem que no grupo vacinado com RB51 (Poester *et al.*, 2006). Os animais vacinados neste estudo não se apresentaram positivos nos testes preconizados pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) para o diagnóstico de brucelose, em exames realizados quinzenalmente no período de um ano pós-vacinação (Poester *et al.*, 2006).

Após a aprovação da utilização da RB51 nos USA em 1996, esta se tornou em poucos anos a vacina do programa de controle e erradicação norte-americano, pois a situação epidemiológica da brucelose naquele país, que já estava em fase muito avançada de erradicação, indicava a necessidade de uma vacina que não interferisse com os testes diagnósticos (Schurig *et al.*, 2002; Paulin e Ferreira Neto, 2003). Desde então, vários países como África do Sul, Argentina, Chile, Espanha, México, Uruguai e Venezuela vêm adotando a vacina RB51 em seus programas de controle, isoladamente ou em conjunto com a utilização da B19 para vacinação em fêmeas jovens e adultas. Os resultados da utilização da RB51 nestes programas de controle têm sido muito eficazes e promissores (Lord *et al.*, 1998; Schurig *et al.*, 2002).

A utilização da RB51 no Brasil está regulamentada pela Instrução Normativa 33/2007 da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA (Instrução ..., 2007). A vacinação com a RB51 é recomendada para fêmeas bovinas com idade superior a oito meses, que não tenham sido vacinadas com B19 entre os três e oito meses de idade, e para fêmeas bovinas adultas em focos de brucelose. A RB51 será uma ferramenta de grande valia para o PNCEBT no controle de brucelose em rebanhos que possuem fêmeas adultas não vacinadas e necessitam aumentar o grau de proteção entre estes animais e em rebanhos com surtos de brucelose, o que resultará em uma menor disseminação do agente com consequente maior rapidez no processo de controle da brucelose no rebanho. Isto acarretará menor prejuízo ao proprietário pela diminuição de abortos e outras perdas decorrentes da infecção por *B. abortus*.

Controle da brucelose

Em um programa de controle de uma doença infecciosa em uma propriedade, é necessário interromper a cadeia de transmissão pela eliminação dos indivíduos infectados ou aumentar o número de indivíduos resistentes da população. No caso da brucelose bovina, ambas as estratégias são utilizadas (Nicoletti, 1990b; Crawford *et al.*, 1990).

Uma das mais poderosas estratégias na estruturação de um programa de controle de brucelose bovina é a vacinação, principalmente a vacinação de fêmeas jovens com B19. Esta vacinação de animais jovens associada à vacinação estratégica com RB51 em fêmeas com idade superior a oito meses acarreta um aumento da cobertura vacinal, de tal forma que diminui a percentagem de indivíduos susceptíveis da população, diminui a taxa de abortos e, conseqüentemente, diminui a taxa de infecção (Schurig *et al.*, 2002; Lage *et al.*, 2005). O segundo ponto no controle da doença é a eliminação do rebanho de animais positivos aos testes diagnósticos o mais rápido possível para se evitar que permaneçam como fontes de infecção para os animais susceptíveis. É de grande importância que estes animais sejam separados do rebanho logo após o diagnóstico, evitando-se que eles abortem ou venham a parir junto aos animais negativos (Crawford *et al.*, 1990). Associadas a estas duas estratégias, a aquisição criteriosa de animais, sempre com exames negativos para brucelose, é uma medida que deve ser adotada para se evitar a entrada de animais infectados na propriedade (Crawford *et al.*, 1990; Lage *et al.*, 2005; Manual ..., 2006). Como a principal forma de introdução da brucelose em um rebanho é a introdução de animais infectados, o poder desta medida nunca deve ser subestimado.

A correta desinfecção de áreas e utensílios contaminados e o destino adequado dos fetos e materiais de aborto também fazem parte das medidas a serem adotadas, pois reduzem consideravelmente a carga infectante para os animais susceptíveis (Wray, 1975; Russel *et al.*, 1984; Manual ..., 2006).

A conscientização de produtores, vaqueiros, tratadores e técnicos é a única forma eficaz e duradoura para a implementação de um programa de controle de brucelose em um rebanho, pois somente com envolvimento de todas as pessoas relacionadas com o manejo dos animais e com o efetivo empenho de cada um no controle da doença as metas e o sucesso do programa serão alcançados.

Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)

No início de 2001, o MAPA instituiu o PNCEBT que normatiza as estratégias e ações para o controle de brucelose e tuberculose no país, no intuito de criar propriedades livres e propriedades monitoradas para ambas as doenças (Instrução ..., 2004). Informações mais aprofundadas sobre tuberculose bovina no país estão contidas em revisões recentes sobre o tema (Manual ..., 2006; Alves *et al.*, 2008; Heinemann *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2008)

Dentre as estratégias do programa, a primeira a ser priorizada foi a implantação, em todo o país, do programa de vacinação obrigatória de bezerras bovinas e bubalinas de três a oito meses de idade com vacina B19 (Lage *et al.*, 2005; Manual ..., 2006; Lage *et al.*, 2008). Com a real implantação do programa de vacinação, houve um aumento significativo do número de bezerras vacinadas, que passou de 2,9 milhões em 2001 para 11 milhões em 2007 (Lage *et al.*; 2008), e espera-se que todos os estados atinjam rapidamente taxas de cobertura vacinal acima de 80%.

Os testes diagnósticos aprovados pelo MAPA no PNCEBT para o diagnóstico de brucelose são o teste com antígeno acidificado tamponado e o teste do anel em leite, como provas de rotina; e os testes do 2-mercaptoetanol e de fixação de complemento, como testes confirmatórios. Para o diagnóstico de tuberculose, os testes de rotina são o teste da prega caudal – somente para gado de corte – e o teste cervical simples; e, como teste confirmatório, o teste cervical comparativo.

Os testes do antígeno acidificado tamponado e do anel em leite e os testes para diagnóstico de tuberculose são realizados por veterinários habilitados pelo MAPA para a execução das atividades do PNCEBT. Os testes de rotina para diagnóstico de brucelose e do 2-mercaptoetanol poderão ser realizados por laboratórios credenciados. Já o teste de fixação de complemento só poderá ser executado por laboratórios oficiais credenciados. São elegíveis ao diagnóstico de brucelose os machos e as fêmeas não vacinadas com idade superior a oito meses e as fêmeas vacinadas com B19 com idade superior a 24 meses. À tuberculinização são elegíveis todos os bovinos e bubalinos com idade superior a seis semanas (Manual ..., 2006).

Para habilitação, os médicos veterinários privados devem ser aprovados em curso de treinamento e capacitação reconhecido pelo MAPA e requerer sua habilitação na Superintendência Federal de Agricultura, em conjunto com os órgãos estaduais de defesa sanitária animal, da respectiva unidade da Federação onde irá atuar.

A certificação de propriedades livres visa à criação de propriedades sem animais infectados por *B. abortus* e *Mycobacterium bovis*. Para a aquisição do certificado de propriedade livre pelo MAPA, a propriedade deve possuir veterinário habilitado responsável pelo rebanho, animais identificados individualmente, vacinar todas as bezerras entre três e oito meses de idade com B19, submeter todos os animais elegíveis a testes periódicos para diagnóstico de brucelose e tuberculose e eliminar os animais reagentes positivos aos testes confirmatórios. Para receber o certificado de propriedade livre, a propriedade necessita obter três exames consecutivos negativos de todos os animais elegíveis para o diagnóstico, sendo o intervalo entre o primeiro e o segundo teste de 90 a 120 dias e entre o segundo e o terceiro de 180 a 240 dias. O terceiro teste deve ser acompanhado pelo serviço oficial de defesa sanitária animal. A renovação da certificação é anual.

A certificação de propriedades monitoradas é exclusiva para propriedades que criam gado de corte. Como na certificação de propriedades livres, para a obtenção do certificado, a propriedade deve possuir médico veterinário habilitado responsável pelo rebanho, animais identificados individualmente e vacinar todas as bezerras entre três e oito meses de idade com B19. Além disso, deve submeter anualmente uma amostra dos reprodutores, machos e fêmeas, a testes diagnósticos para brucelose e tuberculose e eliminar os animais positivos. A amostragem é realizada aleatoriamente entre os reprodutores, machos e fêmeas com idade superior a 24 meses, segundo tabelas apresentadas pelo Regulamento Técnico do PNCEBT (Instrução ..., 2004; Manual ..., 2006) em função do número de reprodutores da propriedade. Os testes devem ser acompanhados pelo serviço oficial de defesa sanitária animal. Dentro do processo de monitoramento, a inspeção sanitária oficial nos frigoríficos é de grande importância. Caso animais positivos sejam encontrados na amostragem ou animais com lesões confirmadas de brucelose ou tuberculose na inspeção em frigorífico, todos os animais do plantel de reprodutores devem ser testados. Os animais reagentes positivos têm que ser sacrificados. Após a execução dessas ações, a propriedade receberá o certificado de propriedade monitorada para brucelose e tuberculose. A renovação da certificação é anual, quando se realizará nova amostragem no plantel de reprodutores, segundo tabela específica do Regulamento Técnico do PNCEBT, procedendo-se às mesmas ações caso sejam encontrados animais positivos aos testes diagnósticos.

Para a participação de animais em feiras e exposições, esses devem apresentar atestados negativos aos exames de brucelose e tuberculose com validade máxima de 60 dias. O trânsito interestadual de animais destinados à reprodução só será permitido para animais negativos aos testes diagnósticos para ambas as doenças. Para a introdução de animais em propriedades certificadas livres ou monitoradas, esses devem ser procedentes de propriedades certificadas livres ou apresentarem dois testes negativos intervalados de 60 dias, um na propriedade de origem e outro na propriedade de destino dos animais. Para as propriedades livres, caso não seja possível manter os animais em local separado do rebanho na propriedade de destino, esses poderão ter os dois testes na propriedade de origem, respeitados os intervalos entre testes.

Zoonose

A brucelose é uma zoonose de difícil diagnóstico em função dos sintomas apresentados, sendo de grande importância em alguns grupos ocupacionais como vaqueiros, magarefes e médicos veterinários. Em países que possuem estatísticas confiáveis de infecção humana por *B. abortus*, observa-se uma alta taxa de infecções em veterinários por acidentes ocorridos pelo manuseio de vacinas (Ashford *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; Corbel *et al.*, 2006).

O homem se infecta pelo contato de mucosas ou de soluções de continuidade com o agente. Nos grupos ocupacionais de maior risco, isto ocorre durante manipulações de material de aborto ou parto e de carcaças de animais infectados ou de fômites contaminados. Outras fontes de contaminação importantes para a população em geral é a ingestão de leite cru ou produtos lácteos preparados com leite cru e carne crua, mal assada ou mal cozida contaminados (Acha e Szyfres, 2003).

Os sintomas mais frequentes são febre intermitente, cefaleia, dores musculares e articulares e sudorese. Geralmente é confundida com gripe recorrente. Pode haver outras complicações como endocardite e problemas articulares (Santos *et al.*, 2005). Como a sintomatologia é bastante inespecífica, é importante que aquelas pessoas, principalmente pertencentes aos grupos de risco e que possam ter sido expostas, alertem os médicos que as assistem sobre a possibilidade da doença (Acha e Szyfres, 2003; Corbel *et al.*, 2006).

O tratamento prolongado, em geral de seis a oito semanas, é realizado à base de antibióticos e deve ser iniciado o mais cedo possível, pois é mais efetivo nos casos agudos. Nos casos crônicos da doença, o tratamento é geralmente pouco eficaz (Young, 1995; Corbel *et al.*, 2006).

Agradecimentos

Andrey Pereira Lage, Tatiane Alves da Paixão, Mariana Noyma Xavier, Teane Milagres Augusto da Silva, Karina Leite Miranda e Renato de Lima Santos são bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Sílvia Minharro é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Parte dos dados apresentados nesta revisão resulta de pesquisas financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), CNPq e FEP-MVZ.

Referências

- Acha PN, Szyfres B. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003. 3v. (Scientific and Technical Publication, 580).
- Alton GG. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust Vet J*, v.54, p.551-557, 1978.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA, 1988. 188p.
- Alves CM, Gonçalves VSP, Mota PMPC, Lage AP. Controle da tuberculose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 68-81, 2008.
- Anselmo, FP, Pavez MM. *Diagnóstico de saúde animal*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1977. 735p.
- Ashford DA, Di Pietra J, Lingappa JJ, Woods C, Noll H, Neville B, Weyant R, Bragg SL, Spiegel RA, Tappero J. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, v.22, p.3435-3439, 2004.
- Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. *Vet Microbiol*, v.90, p.367-382, 2002.
- Bernués A, Manrique E, Maza MT. Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area of Spain. *Prev Vet Med*, v.30, p.137-149, 1997.
- Bovine Brucellosis. In: MANUAL of standards for diagnostic tests and vaccines. 6.ed. Paris: OIE/WHO, 2008. p.624-659.
- Castro D. Prevalência da brucelose nas áreas trabalhadas pelo Iesa em Minas Gerais-1980. *Bol IESA*. v.1, p.1-12, 1982.
- Campero CM. Brucellosis en toros: una revisión. *Rev Med Vet*, v.74, p.8-14, 1993.
- Chosewood LC, Wilson DE. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. Washington: US Government Printing Office, 2007. 409p.
- Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O (Ed.). *Brucellosis in humans and animals*. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.
- Crawford RP, Huber JD, Adams BS. Epidemiology and surveillance. In: Nielsen K, Duncan JR (Ed.). *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.131-151.
- Eaglesome MD, Garcia MM. 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.
- Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, v.90, p.281-297, 2002.
- Heinemann MB, Mota PMPC, Lobato FCF, Leite RC, Lage AP. Tuberculose bovina: uma introdução a

- etiologia, cadeia epidemiológica, patogenia e sinais clínicos. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 1-12, 2008.
- Instrução** normativa nº 6, de 08 de Janeiro de 2004. Aprova o regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. Diário Oficial da União, Brasília, Df, 12 Jan. 2004. Seção 1, p.6.
- Instrução** normativa nº 33, de 24 de Agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 Ago. 2007. Seção 1, p.6.
- Jones FM, Hooper JA.** *Brucella abortus* strain 19 calfood vaccination – a review. *Southwestern Veterinarian*, v.29, p.219-225, 1976.
- Lage AP, Gonçalves VSP, Lobo JR.** O programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose animal em 2008. *Leite Integral*, v.3, p.40-46, 2008.
- Lage AP, Poester FP, Gonçalves VSP, Roxo E, Müller EE, Cavalléro JCM, Ferreira-Neto JS, Motta PMPC, Figueiredo VCF, Lôbo JR.** Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose. *Cad. Tec Vet. Zootec*, n.47, p.99-110, 2005.
- Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoed F, Nöckler, K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G.** Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, v.9, p.1-14, 2006.
- Lord VR, Schuring GG, Cherwonogrodzky JW, Marciano MJ, Melendez GE.** Field study of vaccination of cattle with *Brucella abortus* strains RB51 and 19 under high and low disease prevalence. *Am J Vet Res*, v.59, p.1016-1020, 1998.
- Manthei CA.** Application of research to bovine brucellosis control and eradication programs. *J Dairy Sci*, v.51, p.1115-1120, 1968.
- Manual** técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose – PNCEBT. Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/DAS, 2006. 184p.
- Miranda KL, Alves CM, Minharro S, Lôbo JR, Müller, EE Gonçalves VSP, Lage AP.** Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? *Leite Integral*, v.3, p.44-55, 2008
- Mota PMPC, Alencar AP, Assis RA, Lobato FCF, Lage AP.** Diagnóstico alérgico tuberculose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 13-25, 2008
- Nicoletti P.** Bovine abortion caused by *Brucella* sp. In: Kirkbride, C.A. (Ed.). *Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion*. 3. Ed. Ames: Iowa State University Press, 1990a. p.22-26.
- Nicoletti P.** Vaccination. In: Nielsen K, Duncan JR. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, Crc Press, 1990b. p.283-299.
- Nicoletti P.** The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances Veterinary Science Comparative Medicine*, 1980. v.24, p.69-98.
- Nielsen K, Gall D, Kelly W, Vigliocco A, Henning D, Garcia M.** *Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis*. Nepean, Ontario: Animal Disease Research Institute, OIE Reference Laboratory of Brucellosis, 1996.
- Nielsen K.** Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*, v.90, p.447-459, 2002.
- Olascoaga CRC.** Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis*, v.18, p.107-141, 1976.
- Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G.** Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol*, v.90, p.417-424, 2002.
- Paixão TA, Minharro S, Carvalho Neta AV, Santos RL.** O diagnóstico *post mortem* da tuberculose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.59, p. 26-42, 2008
- Paulin LM, Ferreira-Neto JS.** *O combate à brucelose bovina*. Situação brasileira. Jaboticabal: Editora Funep, 2003. 154p.
- Poester, FP, Gonçalves VSP, Lage AP.** Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*, v. 90, p.55-62, 2002.
- Poester FP, Samartino LE, Lage AP.** Diagnóstico da brucelose bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.13-29, 2005.
- Poester FP, Gonçalves VS, Paixão TA, Santos RL, Olsen SC, Schuring GG, Lage AP.** Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine*, v.24, p.5327-5334, 2006.
- Pruebas** suplementarias para el diagnostico de la brucelosis. Ramos Mejía: Centro Panamericano de Zoonosis, 1982. (Nota técnica, 25).
- Russel AD, Yarnych VS, Koulikovskii AV.** (Ed). *Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases*. Geneva: World Health Organization, 1984. (Who/Vph/84.4)
- Samartino LE, Enright FM.** Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.16, p.95-101, 1993.
- Santos R L, Silva FL, Paixão TA, Samartino LE.** Brucelose: zoonose e bioterrorismo. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.83-98, 2005.
- Schurig GG, Roop RM II, Bagchi T, Boyle S, Buhman D, Sriranganathan N.** Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*. v.28, p.171-188, 1991.



- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ.** Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol*, v.90, p.479-496, 2002.
- Silva FL, Paixão TA, Borges AM, Lage AP, Santos RL.** Brucelose Bovina. *Cad Tec Vet Zootec*, n.47, p.1-12, 2005.
- Situação** epidemiológica da brucelose bovina e bubalina no Brasil (Primeiro relatório parcial). Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 83p.
- Stevens MG, Olsen SC, Cheville NF.** Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet Immuno Immunopathol*, v.44, p.223-235, 1995.
- Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, Cheville NF.** *Brucella abortus* strain RB51: a new brucellosis vaccine for cattle. *Compend Contin Educ Pract Vet*, v.19, p.766-774, 1997.
- Stringfellow DA, Seidel SM.** *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 180p.
- Technical report** on vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. Beltsville, MD: USDA/ARS/NADC, 1999. 11p.
- Técnicas** de seroaglutinação. Ramos Mejía: Centro Panamericano de Zoonosis, 1968. (Nota técnica, 2).
- Thoen CO, Enright F, Cheville NF.** *Brucella*. In: Gyles CL, Thoen CO. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1993. p.236-247.
- Transport** of infectious substances. New York: World Health Organization, 2004. 28p. (WHO/CDS/CSR/LYO/2004.9).
- Wray C.** Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Vet Bull*, v. 45, p.543-550, 1975.
- Wyckoff JH.** Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, v.90, p.395-415, 2002.
- Xavier MN, Paixão TA, Poester FP, Lage AP, Santos RL.** Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol*. v.140, 149-157, 2009.
- Young EJ.** An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*, v.21, p.283-290, 1995.
-