

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UFPR  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO LATU SENSU  
GESTÃO EM DEFESA AGROPECUÁRIA

**ALEXANDRE SANTOS ALVES**

**BRUCELINA AMOSTRA RB 51, FERRAMENTA DE  
CONTROLE PARA BRUCELOSE BOVINA.**

CURITIBA  
2011

ALEXANDRE SANTOS ALVES

**BRUCELINA AMOSTRA RB 51, FERRAMENTA DE  
CONTROLE PARA BRUCELOSE BOVINA.**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Gestão de Defesa Agropecuária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Ms c. Cláudia Maria dos Santos Gebara

CURITIBA  
2011

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ALEXANDRE SANTOS ALVES**


BRUCELINA AMOSTRA RB 51, FERRAMENTA DE CONTROLE PARA BRUCELOSE  
BOVINA.

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do Certificado de Especialização no Curso de Especialização Gestão em Defesa Agropecuária: com ênfase em Defesa Sanitária Animal, Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a): MSc. Cláudia Maria dos Santos Gebara

Membros:

  
Prof. José Francisco Warth

  
Prof. Renato Silva de Sousa

  
Prof. Antonio Waldir Cunha da Silva

Curitiba, 31/08/2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus Pais, pelas mãos calejadas, pelo pão na mesa e o carinho nos atos e ações.

À minha família, por toda alegria, compreensão, carinho presente na minha vida.

A chave de todas as ciências é inegavelmente o ponto de interrogação.

Honoré de Balzac

## **RESUMO**

A Brucelose é uma Zoonose de distribuição mundial, responsável por

sérios prejuízos econômicos à produção pecuária, causando abortamento em bovinos, ocasionalmente em ovinos e caprinos, esterilidade e baixa produção de leite. Pode infectar o homem prejudicando a saúde pública; o que justifica seu controle e erradicação, promovido nos últimos anos pelos órgãos públicos com a criação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001 do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose-PNCEBT. A implantação do PNCEBT busca baixar a prevalência a níveis aceitáveis que permitam passar à fase de erradicação, possível quando ao menos 80% da população de fêmeas adultas tenham sido vacinadas entre 3 e 8 meses de idade. A vacinação contra a brucelose, principal ação do programa, utiliza a cepa *Brucella abortus* B19 e *B. abortus* RB51. A vacina B19 é uma amostra atenuada, indutora de anticorpos que podem interferir no diagnóstico sorológico da brucelose, seu principal inconveniente; enquanto a vacina RB51 induz proteção semelhante, sem induzir a formação de anticorpos que interfiram no diagnóstico sorológico da doença. Este trabalho tem como objetivo revisar a utilização da Brucelina amostra RB 51, como ferramenta de controle para brucelose bovina.

**Palavra-chave:** *Brucella abortus* RB51, vacinação, bovinos

## ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis of world distribution, responsible by serious damages to the cattle raising production, causing abortion in bovines and occasionally in sheep and goat, sterility and low milk production. It can easily infect the man prejudicing the public health; because of this justify its control and eradication, promoted in the last years by the public organs with the creation by the Ministry of Agriculture, Cattle raising and Provision (MACP) in 2001 of the National Program of Control and Eradication of Brucellosis ant Tuberculosis – NPCEBT. The implantation of the NPCEBT tries to reduce the prevalence to acceptable levels that allow passing to the phase of eradication; it is possible when at least 80% of adult female population had been vaccinated in the period of 3 and 8 months. The vaccination against brucellosis, main action of the program, uses *Brucella abortus* strain B19 e *B. abortus* RB51. The vaccine B19 is an attenuated sample, inductor of antibodies that can interfere in the serologic diagnosis of brucellosis, its main obstacle. The Vaccine RB51 promote similar protection without induce, however, the formation of antibodies that interfere in the serologic diagnosis of the disease. This work has as purpose review the use of Brucelina sample RB51, as a tool of control to bovine brucellosis

**Keywords:** *Brucella abortus* RB51, vaccination, bovine

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1 Breve histórico.....	10
2.2 Definição e etiologia.....	10
2.3 Sinais clínicos e patogenia.....	12
2.4 Epidemiologia.....	13
2.5 Diagnóstico.....	15
2.5.1 Métodos diretos.....	15
2.5.2 Métodos indiretos ou sorológicos.....	17
2.6 Respostas imunes.....	18
2.6.1 Mecanismos inespecíficos.....	18
2.6.2 Mecanismos específicos.....	19
2.6.3 Imunidade celular.....	20
2.6.4 Imunidade humoral.....	20
2.7 Vacinas.....	21
2.7.1 Vacina B19.....	22
2.7.2 Vacina RB51.....	23
<b>3. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES</b> .....	26
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27

## 1. INTRODUÇÃO

A Brucelose é uma antropozoonose bacteriana, causada por cocobacilos Gram-negativos, pertencentes ao gênero *Brucella* que infectam tanto humanos, como bovinos, caprinos, suínos, entre outras espécies (ACHA, 2003; POESTER, 2009; SMITH, 1993). Em vários países, a Brucelose é uma das principais enfermidades que provocam abortos em bovinos, retenção de placenta e infecções intrauterinas. Causada por bactérias intracelulares facultativas que se replicam em fagócitos do sistema mononuclear do hospedeiro (PACHECO, 2007).

A Brucelose tem sido alvo de combate em programas de controle e erradicação de vários países, devido a seu risco de ocorrência em humanos prejudicando a saúde pública, como também sua disseminação em populações animais. O Brasil, a partir de 2001 com o lançamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT) organizou as medidas para combatê-la, objetivando reduzir a prevalência e a incidência de novos focos e criar um número significativo de propriedades certificadas ou monitoradas, e que ofereçam ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2006).

A bovinocultura nacional é um dos principais destaques do agronegócio no cenário mundial com segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, liderando as exportações com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (BRASIL, 2006).

Dados de notificações oficiais indicam que a prevalência de animais soropositivos se manteve entre 4% e 5% no período de 1988 a 1998, sendo imperativo programas de controle já que estima-se cause de 20-25% de percas na produção de leite e de carne devido a abortos e problemas de fertilidade e 15% na produção de bezerros além de restrições comerciais (POESTER, 2002; BRASIL, 2006).

Os programas de combate à brucelose bovina se apoiam em medidas higiênicas, preventivas e na utilização de métodos de diagnósticos diretos e indiretos. O PNCEBT tem como estratégia, um conjunto de medidas sanitárias compulsórias. A principal delas é a vacinação de fêmeas jovens de 3 a 8 meses de

idade, seguida do controle de trânsito de animais destinados a reprodução; além da certificação de propriedade livres ou propriedade monitoradas, em que o produtor adere voluntariamente (BRASIL, 2006) .

As vacinas elaboradas com amostras vivas são mais efetivas, possuem menor custo e apresentam imunidade mais duradoura que vacinas inativadas, sendo por isso mais empregada na imunização maciça de bovinos e bubalinos. O mercado disponibiliza boas vacinas para prevenção, entre elas a vacina B19 e, mais recentemente a RB51 têm sido usadas em programas de controle (POESTER, 2006).

Em testes sorológicos ocorrem reações falso-negativas em cerca de 15% das vacas infectadas, imediatamente antes ou após o parto. Reações falso-positivas também são um problema em animais vacinados. Reações cruzadas de soroaglutinação, tem sido observadas em casos de cólera, tularemia (ou por vacinação contra estas enfermidades) e em infecções por *Yersinia enterocolítica* O:9 , *Escherichia coli* O: 157, entre outras. Não podendo ser aplicado os testes de rotina para brucellas rugosas pois as mesmas não possuem a cadeia O no lipopolissacarídeo de parede celular (ACHA, 2003; POESTER, 2009; SMITH,1993).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Breve histórico

Em 1859 o médico da marinha britânica Dr. Martson, descreveu na ilha de Malta, uma doença responsável por causar reumatismo em militares britânicos, como “febre do mediterrâneo”, atrelada inicialmente ao quiasma de matéria orgânica decomposta e ao clima frio. Em 1884 tem início outra pesquisa de outro grupo de trabalho comandado pelo capitão também da marinha britânica David Bruce, que descreve em 1887 o microrganismo *Micrococcus melitensis* como agente da “febre de Malta, e em 1905 Zammit e colaboradores atribuem a infecção humana ao consumo de leite cru de cabras contaminadas, suspendendo seu consumo como medida de controle. Anteriormente, em 1887, os dinamarqueses Bang e Stribolt associaram esta bactéria a aborto em bovinos e deram o nome de *Brucella abortus* ficando conhecida como doença de Bang. Somente em 1918 Alice Evans relacionou *Brucella abortus* e *Micrococcus melitensis* a “Febre de Malta” e passou a chamar-se Brucelose (SILVA, 2007; POESTER, 2009).

### 2.2. Definição e etiologia

A Brucelose é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, zoonótica, que afeta principalmente bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cães, causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, composto por nove espécies, sendo *B. abortus*, *B. Suis*, *B. melitenses*, lisas e altamente patogênicas, *B. canis* e a *B. ovis* naturalmente rugosas, *B. neotomae* e *B. microti* isoladas em roedores silvestres e que não são consideradas zoonóticas, *B. ceti* *B. pinnipedialis* patogênicas para mamíferos marinhos. A classificação em lisa ou rugosa deve-se a morfologia colonial

em função da presença ou ausência da cadeia O do polissacarídeo. As lisas possuem resíduos de um homopolímero linear de 4,6-dideoxi-4-formamido-alfa-D-manopiranosil, conhecida como perosamina, uma fração larga denominada cadeia O correspondente ao antígeno imonodominante que provoca a formação de anticorpos. Colonias lisas de *B. abortus* podem se diferenciar das rugosas pela incapacidade de aglutinarem numa solução de acriflavina a 0,1%. Todas as espécies são do gênero cocobactérias Gram negativas, medem 0,6 a 1,5 µm por 0,5 a 0,7 µm de dimensão, aeróbias ou microaerófilas, imóveis e aflageladas, não formam esporos nem cápsulas verdadeiras (CORRÊA, 1983; HIRSH, 2003; QUINN, 1994, POESTER, 2006).

As bactérias gênero *Brucella* resistem bem em condições ambientais favoráveis, sobrevive a congelamento e descongelamento. Entretanto, diminuem a resistência com aumento da temperatura e a incidência direta da luz solar ou diminuição da umidade. A sobrevivência de *Brucella sp* em esterco líquido é inversamente proporcional à temperatura dele, pois pode sobreviver nesse material por 8 meses a 15°C, enquanto que só resiste por 4 horas se a temperatura do material for de 45° – 50°C (BRASIL, 2006; HIRSH, 2003).

A Brucelose, causada por *B. abortus*, é caracterizada pelo aborto em fêmeas e, em menor grau, orquite e infecção das glândulas sexuais acessórias em machos e infertilidade em ambos os sexos. A doença é prevalente na maior parte do mundo. Ocasionalmente, a brucelose acomete equino, nos quais a bactéria localiza-se geralmente na bursa, tendões, músculos e articulações, bem como, tecidos e o trato reprodutivo, nos quais o achado clínico clássico é o abscesso fistulado, denominado mal da cernelha ou mal das cruzes (ACHA, 2003; POESTER *et al.*, 2009).

Os seres humanos geralmente adquirem a doença através do contato direto com animais infectados, por comer ou beber produtos de origem animal contaminados, ou pela inalação do agente. O período de incubação em geral dura de uma a três semanas, porém às vezes pode prolongar-se por vários meses. O consumo de leite cru e queijo feito de leite cru (queijo fresco) é a principal fonte de infecção para o homem. A doença causa na sua forma aguda, calafrios, sudorese

com elevação de temperatura, fraqueza, mal-estar e perda de peso. Os sintomas comuns são insônia, impotência sexual, constipação, anorexia, dor de cabeça, artralgia e dores pelo corpo. Abordagem mais racional para a prevenção da brucelose humana é o controle e eliminação da infecção em animais. Pasteurização do leite é outro mecanismo de proteção. A vacinação do gado é recomendada para o controle da brucelose bovina em áreas enzoóticas com altas taxas de prevalência. A erradicação é preconizada em regiões com baixa prevalência, através de teste e abate dos animais positivos; caminho para a eliminação da brucelose (OIE, 2011; ACHA, 2003).

### **2.3 Sinais clínicos e patogenia**

As brucelas podem penetrar superfícies das mucosas intactas ou soluções de continuidade. Após podem ser fagocitadas por células de defesa (neutrófilos/macrófagos). Os receptores específicos dos macrófagos parecem mediar a fixação e captação das brucelas, que empregam vários mecanismos para sobreviver e multiplicar-se nas células fagocíticas. O principal mecanismo para sobrevivência intracelular é a inibição da função fagossomo-lisossomo além de ser importante determinante da virulência bacteriana ( SMITH, 1993; HIRSH, 2003).

A replicação inicial das brucelas ocorre em linfonodos regionais. A bacteremia é seguida pela colonização dos linfonodos supra-mamários, glândula mamária e útero gravídico. A infecção uterina ocorre durante o segundo trimestre. Na placenta, as bactérias surgem primeiramente nos fagossomos de trofoblastos eritrofagocitários. A replicação preferencial nos trofoblastos corioalantóicos foi atribuída ao seu conteúdo de eritritol. O microrganismo poderá ocorrer também nas células endoteliais placentárias fetais e lúmens capilares, associado à vasculite e à destruição das vilosidades coriônicas. A inflamação placentária se dissemina ao longo do alantocório, cotilédones, com ulceração corioalantóica, necrose dos trofoblastos e endometrite ulcerativa. A morte fetal provavelmente resulta da ruptura placentária e endotoxemia ou do estresse do feto resultante da resposta inflamatória. Frequentemente há retenção fetal durante 1 a 3 dias no útero.

Numerosas bactérias são eliminadas pelo trato genital por ocasião do parto, mas tal eliminação comumente é interrompida por volta da 3 semanas após o abortamento (ACHA, 2003; HIRSH, 2003; SMITH, 1993).

O abortamento é o principal sinal clínico da brucelose bovina, em rebanhos onde a doença é endêmica, geralmente ocorre após o quinto mês de gestação, mas nas gestações subseqüentes tornar-se normal, possivelmente por causa da imunidade adquirida. Os ovinos e caprinos infectados abortam comumente no quarto mês de gestação. Porcas infectadas pelo macho durante a cobertura sofrem aborto em média aos 35 dias de gestação. Muitas vezes a infecção não é aparente. Nesse caso o único sinal de brucelose no rebanho é o grande número de porcas voltando ao cio entre 5 a 8 semanas após a cobertura. A bactéria é eliminada no leite e nas descargas uterinas e a vaca pode estar temporariamente estéril. A infecção com *B. abortus* ocorre naturalmente por ingestão. Os materiais contaminados são infecciosos para pessoas, devendo ser manipulados com cuidado (ACHA, 2003; HIRSH, 2003; ; SOBESTIANSKY *et al.* 1993).

## 2.4 Epidemiologia

Estudos mostram que a brucelose bovina parece estar disseminada por todo o território brasileiro, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada (POESTER, 2006; VALENTE, 2009).

Dias *et al.* (2009) realizou um estudo para caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná no período de dezembro de 2001 a julho de 2002, a fim de estimar a prevalência e identificar os fatores de risco para a brucelose bovina no estado, além fornecer subsídios para a melhor implantação e gestão do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Este trabalho encontrou uma prevalência para focos de brucelose em propriedades do Estado do Paraná, que variou de 0,34 a 17,72% e para animais soropositivos, segundo o circuito produtor, a prevalência variou de 0,09 a 2,82% dados estes explicados por diferentes sistemas produtivos formados pela contribuição de diferentes condições geográficas, sociais e

econômicas. Neste trabalho o Estado do Parana foi dividido em sete circuitos produtores de bovinos (1-noroeste, 2-centro-oeste-norte, 3-norte-pioneiro, 4-centro-sul, 5-oeste, 6-leste-sul, 7- sudoeste) com o objetivo de destacar as diferenças regionais nos parâmetros epidemiológicos da brucelose diferenciando-se práticas de manejo, finalidades de exploração, tamanho médios de rebanhos e sistemas de comercialização. Cada circuito estimou a prevalência de propriedades infectadas e de animais soropositivos, pois segundo Valente *et al.* (2009), o caráter infeccioso da brucelose faz com que rebanhos infectados sejam capazes de contaminar outros que estejam ao seu redor e trazer prejuízos. Esses efeitos chamados de externalidades negativas mostram que rebanhos com prevenção eficiente correm risco em relação aqueles vizinhos que não possuem controle adequado. Devendo as estratégias dos programas de controle e erradicação em relação a esse tipo de doença englobar todos os estabelecimentos produtivos a fazerem parte de um planejamento em âmbito nacional. Pois, um controle eficaz isolado de um Estado, estabelecimento produtivo ou circuito produtivo, tem sua eficácia sujeita a eficiência do vizinho reduzindo positivamente para o mesmo o risco de contaminação, efeitos esses chamados de externalidade positiva.

No Rio Grande do Sul, a prevalência decresceu de 2%, em 1975, para 0,3%, em 1986. Em Santa Catarina, passou de 0,2%, em 1975, para 0,6%, em 1996. No Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada em 1998 foi de 6,3%, semelhante à de 1975 no antigo Estado do Mato Grosso. Em Minas Gerais, passou de 7,6%, em 1975, para 6,7%, em 1980. No Paraná, a prevalência estimada em 1975 foi de 9,6%, passando para 4,6% em 1989 (BRASIL, 2006).

De acordo com levantamento recente, planejado por técnicos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Universidade de São Paulo e da Universidade de Brasília, em colaboração com os técnicos dos Serviços Veterinários Oficiais dos Estados realizado em 15 unidades federativas brasileiras, a saber: Bahia, Santa Catarina, Espírito Santo, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo, Sergipe e Tocantins que representam segundo dados do IBGE em 2007, 82,12% do efetivo bovino nacional; a prevalência de animais

soropositivos para brucelose bovina foi de 0,3 a 10,2 % e prevalência de focos de 0,3 a 41,6% (FERREIRA NETO, 2009).

## 2.5 Diagnóstico

### 2.5.1 Métodos Diretos

Pode ser feito diagnóstico pelo isolamento e identificação do agente a partir de material de aborto (feto, conteúdo estomacal de feto, placenta) ou de secreções, porém devido ao risco de contaminação humana durante a manipulação da amostra, poucos laboratórios realizam o exame (BRASIL, 2006). O isolamento é feito através do crescimento da brucela ágar sangue 5 a 10%, contudo, conteúdo do abomaso fetal ou colostro podem ter contaminação por muitas bactérias e fungos, sendo necessários meios seletivos. Os meios contém uma base nutritiva de agar sangue com 5% soro bovino ou equino estéril e um suplemento de antibiótico. O cultivo é incubado a 37° C em uma atmosfera de 5 a 10% de CO<sup>2</sup>, por até 15 dias (QUINN *et al.* 1994). Outro método muito sensível é a inoculação em cobaias que na terceira e na sexta semana após inoculação, seu soro é examinado quanto a presença de anticorpos e os tecidos são cultivados para observação dos organismos depois do sacrifício (HIRSH, 2003). A identificação pode ser feita pela morfologia das colônias após 3 a 5 dias de incubação, aspectos microscópicos, testes bioquímicos, biotipagem da brucela e ainda, teste de anticorpo fluorescente para identificação rápida. A cepa B19 de *B. abortus* pode ser distinta de cepas de campo por não exigir CO<sup>2</sup> para o seu crescimento e por ser inibida por 5 mg/ml de penicilina ou 1 mg/ml de eritritol, enquanto a cepa RB51 pode ser distinguida da cepa de campo ou B19 por sua resistência à rifampicina, corar-se em cristal violeta e aglutinar-se com acriflavina (QUINN, *et al.* 1994; HIRSH, 2003).

Também pode ser realizado através da imunohistoquímica, em material abortivo previamente fixado em formol, possibilitando a visualização de aspectos macroscópicos do tecido e identificação do agente (BRASIL, 2006).

Pode também ser feito o diagnóstico através de métodos de detecção

de ácidos nucléicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR) que detecta um seguimento do DNA específico da *Brucella abortus* em tecidos, os quais: material de aborto, secreções e excreções. Porém requer equipamento sofisticado e pessoal treinado, mas é uma técnica bastante sensível e específica (QUINN, 2005; BRASIL, 2006).

Miyashiro (2004) utilizando a técnica de PCR detectou a presença de *Brucella sp.* em 19,27% das amostras de queijo analisadas. Posteriormente, pela reação de PCR para diferenciação das amostras analisadas revelou que 100% das amostras positivas eram da espécie *Brucella abortus*, outra etapa revelou a presença de B19 em 81,08 % das amostras positivas, e 18,92% de cepa de campo.

Pacheco (2007) utilizando PCR-multiplex diferenciou amostras de cepa vacinal B19 em leite e urina de animais vacinados da *Brucella sp.* Foi feito cultivo microbiológico para isolamento de *Brucella sp.*, onde as amostras de leite e urina foram semeadas em ágar *Brucella* acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro com e sem adição de mistura de antibiótico (Polimixina B, Bacitracina, Novobiocina e Cicloheximida). As placas foram inoculadas em microaerofilia e aerobiose, a 37°C por até 10 dias. Procedeu-se a extração do DNA das amostras de leite e urina. Utilizou-se a técnica de PCR para detectar *Brucella sp.* em amostras de leite e urina empregado-se o par de “primers” gênero-específico B4 (TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA) e B5 (GTC TGG ACT TTC CGT TCG CGC). Como controle positivo da reação para brucelose, foi empregado uma suspensão bacteriana em cultura da estirpe padrão de *B. abortus* ATCC 544. Como controle negativo da PCR foi utilizada a mistura da reação da PCR sem DNA, contendo água ultrapura. A técnica de PCR para diferenciação da origem da estirpe foi realizada a partir do DNA extraído das amostras positivas na PCR para *Brucella spp.*, empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores ery 1 (GCG CCG CGA AGA ACT TAT CAA) e ery 2 (CGC CAT GTT AGC GGC GGT GA) que diferenciam a origem da estirpe de *Brucella abortus* de campo ou vacinal.

### 2.5.2 Métodos Indiretos ou Sorológicos

Existem vários testes que visam demonstrar a presença de anticorpos contra *Brucella sp.* em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e ocasionalmente em sêmen. Os testes de imunodiagnósticos para bovinos detectam diferentes classes e tipos de anticorpos com sensibilidade e especificidade variadas. Amostras de sangue podem ser testadas por aglutinação em tubo, aglutinação em placa, placa rosa-bengala ou provas de cartão. Outros incluem aglutinação em placa tamponada, aglutinação em rivanol, fixação de complemento e ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Frequentemente, testes muito sensíveis e pouco específicos são usados para investigação e acompanhados por testes mais específicos para confirmação diagnóstica. A presença de anticorpos não específicos devido a infecção por outras bactérias como a *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas sp.* podem levar a reações falso-positivas ou podem ser resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada (BRASIL, 2006; HIRSH, 2003).

Os testes classificam-se geralmente em função do antígeno usado na reação. Células inteiras de *B. abortus*, são utilizadas nos testes de aglutinação (lenta, com antígeno acidificado, do anel em leite, de Coombs), de fixação do complemento ou imunofluorescência indireta. Nos testes de imunodifusão em gel (dupla ou radial), ELISA (indireto e competitivo), hemólise indireta e *Western blot*, o antígeno é representado pelo lipopolissacarídeo da parede celular da *B. abortus* semipurificado (BRASIL, 2006).

No Brasil, o PNCEBT definiu como oficiais os seguintes testes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite (TAL), 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC). Os dois primeiros como testes de triagem; os dois últimos como confirmatórios. Células inteiras da amostra de *B. abortus* 1119-3 são utilizadas na preparação dos antígenos (BRASIL, 2006). Os teste do AAT e Anel do Leite podem ser realizados por médicos veterinários habilitados e os testes do 2-ME e FC, por laboratórios oficiais e credenciados pelo MAPA.

## 2.6 Respostas imunes

### 2.6.1 Mecanismos inespecíficos

Os fatores inespecíficos da resposta imune são constituídos por mecanismos superficiais e mecanismos profundos que existem antes da infecção e são capazes de rápidas respostas; dificultam a penetração, a implantação e/ou a multiplicação dos agentes infecciosos, tais como: microbiota e integridade de pele e mucosas; secreções e excreções; peristaltismo intestinal; acidez gástrica e urinária; alcalinidade do suco pancreático; ação mucolítica e bactericida da bile; ação da lisozima presente na lágrima, saliva e secreções nasais; fatores séricos e teciduais (betalisina, complemento, interferon, fibronectina, lactoferrina, tuftisina, espermina e protamina); inflamação e fagocitose (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001; PARSLOW, 2004).

Esta resposta imune inata, desempenha papel relevante na infecção por *B. abortus*, pois atua na redução do número inicial de bactérias através principalmente das células fagocíticas: neutrófilos e especialmente macrófagos, como também prepara um ambiente adequado para geração da resposta imune adquirida. Porém para ativação destes fagócitos é necessário o reconhecimento da *B. abortus* pelos receptores da superfície celular semelhantes a Toll (TLR do inglês *Toll like receptor*). Os TLRs são homólogos de uma proteína chamada Toll da *Drosófila melanogaster* nas quais tem função de defesa antimicrobiana. Como componentes da resposta imune inata, os TLRs são ativados em resposta a componentes conservados de microrganismos como: lipoproteínas bacterianas, flagelinas e LPS (CARVALHO NETA, 2007; PAIXÃO, 2009).

A resposta imune inata na infecção por *B. abortus* também é composta pela atividade citotóxica das células “natural killer” (NK), podendo em bovinos se apresentar como células de defesa direta ou secretoras de citocina que estimulam a atividade bactericida dos macrófagos, opsonização através do sistema complemento para eliminação imediata ou sua interação com a neutralização por anticorpos (CARVALHO NETAS, 2007).

### 2.6.2 Mecanismos específicos

A evolução biológica levou ao aprimoramento da resposta imune nos organismos superiores possibilitando uma resposta específica e duradoura contra os patógenos pelos quais foram estimulados, tais como componentes estruturais de um complexo proteico, de um polissacarídeo ou de outras macromoléculas (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001).

O antígeno através da pele e/ou de mucosas atinge a circulação sanguínea e linfática e alcança órgãos linfoides secundários (gânglios linfáticos, baço e nódulos linfoides). A qual pode ser dividido em três fases: reconhecimento do antígeno, ativação dos linfócitos e fase efetora da resposta imune, que requer vários mecanismos de defesa incluindo o sistema do complemento e os fagócitos, que também atuam na imunidade inata (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001).

Os linfócitos sofrem nos órgãos linfoides primários, processos de diferenciação celular resultando no aparecimento de linfócitos B que são capazes de sintetizar proteínas denominadas imunoglobulinas que se ligam especificamente e com alta afinidade a antígenos, e T, que detectam a presença de substâncias estranhas através de proteínas de superfícies, cujas atividades são distintas e complementares. As linhagens de linfócitos T e de linfócitos B constituem os clones, que diferem, na sua especificidade para os antígenos. A grande variedade de clones existentes é que garante a ampla diversidade da resposta imune (ABBAS, 2003; BRASI, 2001; PARSLOW, 2004).

Os linfócitos T reconhecem especificamente a *B. abortus* através de seus receptores  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$ , em associação com uma molécula co-receptora CD4+, em linfócitos T auxiliares ou CD8+, em linfócitos T citotóxicos. Os mesmos podem contribuir para o controle da infecção por *Brucella* no homem devido à combinação de mecanismos incluindo lise de macrófagos infectados via efeitos citotóxicos e redução da carga bacteriana pela secreção de peptídeos e citocinas antimicrobianas (CARVALHO NETA, 2007; PAIXÃO, 2009).

### 2.6.3 Imunidade celular

A imunidade celular, dá-se como resultado da ativação de linfócitos T, com o aparecimento de diversas subpopulações dessas células. A imunidade celular é responsável predominantemente pela proteção específica contra infecções intracelulares, causadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários, que sobrevivem e proliferam dentro dos fagócitos e de outras células do hospedeiro, onde ficam inacessíveis aos anticorpos circulantes (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001).

A imunidade adaptativa mediada por linfócitos B e T que reconhecem patógenos por meio de receptores de alta afinidade, enquanto a imunidade inata com mecanismos de defesa mais rápidos, reconhecem patógenos invasores por meio de receptores específicos, localizados na superfície das células apresentadoras de antígenos, tal ligação patógeno/receptor, induz à produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adaptativa, caracterizada pela especificidade e memória (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001; POESTER, 2006).

### 2.6.4 Imunidade humoral

Mediada por linfócitos e pelos produtos por eles secretados, os anticorpos, atuam na defesa contra microrganismos extracelulares. São responsáveis pela produção de substâncias com alto peso molecular, as imunoglobulinas que são capazes de reagir com o antígeno responsável pelo seu aparecimento. As respostas de imunidade humoral são mais duradouras quando há participação de linfócitos T-auxiliares na ativação de linfócitos B (ABBAS, 2003; BRASIL, 2001).

Três classes de imunoglobulinas séricas (IgM, IgG e IgA) e as IgA-secretoras, atuam na imunidade contra os agentes infecciosos. Na resposta da imunidade humoral que se segue ao primeiro contato com o antígeno (resposta primária) há um período de latência de alguns dias ou algumas semanas entre o

estímulo e o aparecimento de anticorpos séricos: de início aparecem os anticorpos da classe IgM (cujo desaparecimento geralmente se dá no fim de algumas semanas ou meses), seguidos pelos anticorpos das classes IgA e IgG. Os anticorpos da classe IgG são detectados no sangue durante tempo prolongado, constituindo a sua presença indicação de imunidade ou contato prévio com o antígeno em questão. Apesar de demonstrarem atividade opsonizante na brucelose bovina, a atuação da IgG durante a infecção ativa é controversa, pois não permite a lise bacteriana extracelular pela via alternativa do complemento, promovendo maior fagocitose e infecção de macrófagos, o que determina o aumento do número de bactérias intracelulares e consequente persistência da infecção. Embora a resposta imune humoral seja pouco eficaz como atividade efetora, seus anticorpos produzidos durante a infecção são essenciais para diagnóstico e identificação da doença no rebanho e estabelecimento das estratégias de controle (ABBAS, 2003; CARVALHO NETA,, 2009; BRASIL, 2001).

Após a infecção por bactérias Gram-negativas, as células do sistema imunológico do hospedeiro estão expostas a diversos antígenos bacterianos e, por estar mais expostas, a cadeia O do lipopolissacarídeo da parede celular é a fração mais imunogênica. Apesar de ser um carboidrato, a cadeia O das bactérias Gram-negativas é capaz de provocar uma resposta consistente de anticorpos pela ativação direta dos linfócitos B, sem necessidade da ativação direta dos linfócitos T. A resistência a patógenos intracelulares como *Brucella* é altamente dependente da habilidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune celular, mediadas por citocinas como IFN $\gamma$ , IL-12, IL-2, TNF $\alpha$  (PAIXÃO, 2009; POESTER, 2006).

## 2.7 Vacinas

A vacinação contra a brucelose bovina tem sido uma ferramenta importante nos programas de controle e erradicação desta enfermidade em vários países mostrando-se eficaz. Embora, nenhuma vacina usada, proteja 100% dos animais, necessitando esta prática de medidas complementares de higiene associada à retirada e substituição dos animais infectados (POESTER, 2006).

Vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença. Um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidade, recombinantes e de DNA vem sendo desenvolvidas. Porém as vacinas atenuadas foram e ainda são utilizadas efetivamente nos programas de controle de brucelose. As mais empregadas são a B19 e a não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB 51). Ambas boas indutoras de imunidade celular e recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (BRASIL, 2006).

### **2.7.1 Vacina B19**

A vacina B19 foi avaliada pela primeira vez em 1930. John M. Buck, pesquisador norte-americano, isolou em 1923 uma bactéria com características de *B. abortus* do leite de uma vaca estéril. A cultura originalmente virulenta, ficou esquecida no ambiente por mais de um ano. Testada em cobaias, revelou-se atenuada e altamente imunogênica. Suas principais características: baixa patogenicidade e estabilidade, alta imunogenicidade e antigenicidade levou a seu sucesso como vacina. A B19 é uma amostra de *Brucella abortus* lisa, indutora de formação de anticorpos específicos contra o LPS liso, podendo interferir no diagnóstico sorológico para brucelose, conferindo imunidade de 65 a 75% em animais vacinados. A B19 é uma vacina atenuada para fêmeas jovens, administrada dos 3 aos 8 meses de idade, por recomendação do PNCEBT. Pode causar orquite e provocar aborto, não sendo recomendada para animais prenhes ou machos. Há risco de contaminação humana e desenvolvimento da doença. Há na literatura descrição de casos entre veterinário ou ajudante que tenham picado o dedo ou a mão com a agulha da seringa de vacinação ou recebido aerosol nos olhos. O curso da enfermidade geralmente é mais benigno do que com cepas de *B. abortus* de campo, porém em casos severos requerem hospitalização. Deve-se adotar equipamento de proteção individual (óculos de proteção, luvas, etc.) e destino correto para descarte de seringas e frascos de vacina (ACHA, 2003; BRASIL, 2006; POESTER, 2006 ).

Uma derivação da cepa B19 é empregada também, para imunização de grupos ocupacionais, de alto risco como magarefes, na antiga União Soviética, aplicada na pele escarificada, aparentemente com bons resultados (ACHA, 2003).

### 2.7.2 Vacina RB51

Pesquisas realizadas no passado, comprovaram que amostras rugosas eram capazes de induzir proteção contra *B. abortus*, sem apresentarem os problemas de diagnóstico inerentes às amostras lisas. Buscou-se encontrar uma amostra mutante rugosa, estável e de tal forma atenuada que permitisse a colonização no hospedeiro. Chegando a seleção da amostra de *B. abortus* chamada RB51 (POESTER, 2006).

A vacina RB51 é uma amostra não aglutinogênica, derivada da amostra 2308 de *B. abortus*, que por passagens em meio contendo concentrações sub-inibitórias de rifampicina e penicilina sofreu mutações em genes que sintetizam a cadeia O. Quando aplicada em animais jovens, a vacina RB51 localiza-se nos tecidos do sistema retículo-endotelial, sendo eliminada dos linfonodos que drenam o local da inoculação por períodos que vão desde 6 semanas até 12 a 14 semanas pós-vacinação (BRASIL, 2006; POESTER, 2006).

Pesquisas indicaram que a idade ideal para a vacinação de fêmeas jovens é entre 5 e 12 meses de idade, com revacinação aos 4 – 5 anos para manter bons níveis de proteção imunitária. Deve-se adotar equipamento de proteção individual, e tomar os cuidados de manipulação que se emprega para a vacina B19 (POESTER, 2006).

Em estudo conduzido por Kreeger *et al.* sobre a eficácia e segurança da vacina da *Brucella abortus* amostra RB51 aplicada em alces prenhes em cativeiro, afim de determinar se a RB51 induziria aborto e se protegeria de aborto provocado por *B. abortus* 2308 administrada 40 dias após vacinação; a vacina RB51 foi capaz de prevenir 28% de diminuição das taxas de aborto entre os alces vacinados quando para o grupo controle o aborto foi de 100%. As razões para baixa proteção pode ter sido: dose da vacina insuficiente (mesma usada em bovinos jovens), dose excessiva

no desafio, insuficiente tempo entre a vacinação e o desafio para desenvolver a imunidade celular, ou falta de eficácia da estirpe RB51 no alce.

Caporale (2010) *et al.* investigando a vacinação de búfalos na Itália com *Brucella abortus* RB51, com amostra experimental estabelecida pela OIE para avaliação de vacinas em camundongos (cinco animais por grupo), utilizou o triplo da dose vacinal preconizada para bovinos no grupo vacinado para RB51 seguido de um reforço após um mês de sua inoculação primária. Relata que pareceu ser capaz de oferecer proteção contra infecção de diferentes tipos de *Brucella* de organismos selvagens. Mesmo considerando as limitações pelo baixo número de animais inoculados, os resultados sorológicos obtidos após o desafio, parecem confirmar que a inoculação do agente não induziu a infecção, pois nenhum animal desenvolveu anticorpos anti-lisos de fixação de complemento. O protocolo mostrou-se seguro em animais jovens, enquanto sua aplicação em búfalas adultas grávidas causou aborto.

Poester (2006) *et al.* estudando a eficácia da vacina RB51 em novilhas, concluiu como resultado do trabalho, que a indicação da vacinação com a RB51, utilizando-se dose completa ( $1,0-3,4 \times 10^{10}$  UFC), induz imunidade protetora contra o desafio com amostra virulenta de *B. abortus*; que a mesma não causou aborto ou infecção quando aplicada em fêmeas no início da gestação e não interferiu com os testes sorológicos convencionais. Embora destaque que estudos em populações a campo devem ser implementados sempre que possíveis, pois darão uma resposta mais condizente com a realidade.

Peniche (2009) *et al.* avaliou a vacinação com *Brucella abortus* amostra RB51 em rebanhos bovinos de duplo propósito, naturalmente infectados com brucelose em sistemas produtivos a campo encontrado em clima tropical. Entre vacinados e não vacinados o grupo foi formado por 88 fêmeas cada. Durante os 18 meses do experimento, três novos casos de infecção ocorreram no grupo não vacinado, enquanto que no grupo vacinado com a mostra RB51 a taxa de infecção foi de 0%, com eficácia de 100% de proteção atribuída a vacina. A amostra RB51 foi utilizada na dose de  $5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônias (UFC) em fêmeas de 6 a 12 meses de idade e animais com mais de 12 meses, incluindo fêmeas

gestantes  $3 \times 10^8$  e  $3 \times 10^9$  UFC. No momento da criação do grupo experimental, 32 fêmeas gestantes foram integradas ao grupo vacinado e 36 gestantes ao grupo não vacinado. Salientou que nenhuma das 32 fêmeas abortou em função da aplicação da vacina RB51. Casos de soropositivos não foram eliminados nem segregados da população. Sua conclusão dos resultados é que para rebanhos de produção extensiva a campo, infectados naturalmente, com prevalência 6%, a amostra RB51 é um produto eficaz para controle da brucelose bovina.

A maioria dos estudos sobre a proteção conferida pela RB51 tem sido realizada sob condições rigorosamente controladas seja com camundongos ou em bovinos. Pasquali *et al.* (2001) estudando a resposta imune de camundongos vacinados com *Brucella abortus* RB51 infectados com *B. abortus* 2308 indicou que os mesmos foram protegidos de reinfeção depois da vacinação, demonstrando resposta celular consistente, em razão da presença de Th1 e Th2.

No Chile, Villarroel *et al.* procedeu isolamento e identificação *Brucella abortus* RB51 proveniente de humanos. Uma linhagem de *Brucella* foi isolada em uma hemocultura de um médico veterinário com sintomatologia clínica, baseado principalmente em características como: resistência à rifampicina, crescimento aeróbio e produção de colônias apenas rugosas. A cepa RB51 foi confirmada por análise de PCR. O paciente apresentava principalmente febre recorrente (a 39° C), abatimento, anorexia, osteo mialgias, sudorese noturna e dor de cabeça.

A Instrução Normativa N° 33, de 24 de agosto de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece duas condições em que se permite a utilização da vacina não indutora de anticorpos aglutinantes, amostra RB 51, a saber: idade superior a 8 (oito) meses e que não foram vacinadas com a amostra B19 entre 3 e 8 meses de idade; ou adultas, não reagentes aos testes diagnósticos, em estabelecimentos de criação com focos de brucelose. Atualmente a vacina RB51 é utilizada nos programas oficiais de controle em países como EUA, México e Chile entre outros (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007; FUNDEPECPR, 2011).

### 3 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

A vacinação contra Brucelose Bovina é obrigatória no Brasil. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT preconiza a utilização da amostra B19 para vacinação de fêmeas bovinas jovens 3 a 8 meses de idade e a amostra RB51 será empregada como estratégia para fêmeas adultas.

Vários são os motivos que levam a uma baixo índice de vacinação nesta faixa etária, sujeitando os produtores a multas e restrição de trânsito, controlados pelos órgãos oficiais dos estados através da Guia de Trânsito Animal (GTA). Porém, estes rebanhos não vacinados com a B19, podem interferir no sucesso de planos de erradicação, por estarem susceptíveis a infecção, por isso a opção por utilizar a vacina RB51 nestas fêmeas acima de oito meses, é imperativo.

Os produtores dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, realizam intenso comércio de animais oriundos de Santa Catarina, único estado da Federação a ter erradicado a Brucelose Bovina, não adotando mais programas de vacinação. Seria de grande valor o uso da vacina RB51, nestas situações ; pois permite a vacinação de fêmeas bovinas acima de 8 meses.

A vacina RB51 mostrou-se uma ferramenta eficaz para promover o controle imunológico dos rebanhos, com segurança semelhante à vacina B19, sem o inconveniente de interferir no diagnóstico sorológico de rotina e podendo ser usada em animais adultos, aumentando seus níveis de proteção. Tem a desvantagem, de em infecção acidental de humanos, ser mais difícil o tratamento em razão de sua resistência a rifampicina e penicilina e seu diagnóstico dificultado por não ser detectado em testes imunoaglutinantes como o AAT. O País carece de estudos sobre a vacinação com a RB51 em rebanhos a campo em suas variadas categorias (animais jovens, adultos) e sua persistência, pois a maioria dos estudos estão sob condições controladas; o impacto de sua excreção por animais vacinados no ambiente, com a possibilidade de transmissão a susceptíveis, inclusive ao homem; o efeito da dose de vacinação sob efetiva resposta imune, como seu efeito em outras espécies, dentre outras demandas que se iniciam a partir da pesquisa.

#### **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A., K., LICHTMAN, A., H., POBER, J., S., **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003, 544p.

ACHA P. N.; SZYFRES Organización Panamericana de la Salud **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** 3 ed., Washington, EUA. 2003. 398 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 33 de 8 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. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de agosto 2007, Seção 1, 6 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): Manual Técnico**. Brasília. 2006. 184 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual de Normas de Vacinação**. 3 ed., Brasília. 2001. 58 p.

CAPORALE, V. BARBARA, B., GIANNATALE, E., PROVVIDO, A., SIMONA, F., ARMANDO, G., MANUELA, T., MASSINO, S. **Efficacy of Brucella abortus vaccine strain RB51 compared to the reference Brucella abortus strain 19 in water buffalo**. Veterinaria Italiana, 2010, v.46, p.1-13.

CARDEÑA, A., P., HERRERA, D., M., ZAMORA, J., L., F., PINA, F. B., SANCHES, B. M., RUÍZ, E. J. G., WILLIAMS, J. J., ALVAREZ, F. M., CASTRO, R. F. **Evaluation of vaccination with Brucella abortus RB51 strain in herds naturally infected with brucellosis in productive systems found in tropical climate**. International Journal of Dairy Science, 2009, v.4, supl.3, p.109-116.

CARVALHO NETA, A. V. C., **Perfil de expressão gênica em células trofoblásticas bovinas durante a infecção por Brucella abortus**. 2007. 73 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

CORRÊA, W., M.; CORRÊA, C., N., M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Botucatu – SP: Varela, 1983, 823p.

DIAS, J., A. MÜLLER, E. E., DIAS, R. A., FREITAS, J. C., et al. **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009, v.61, supl. 1, p.66-76.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1991, 1803p.

FERREIRA NETO, J. S. **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: Bases para as intervenções** VIII Congresso Brasileiro de Buiatria – Anais, Belo

Horizonte, 2009, supl. 1.

FUNDEPECPR- **Fundo de desenvolvimento da agropecuária do Estado do Paraná**. 2011. Disponível em: [http://www.fundepecpr.org.br/?pag=brucelose\\_controle\\_da\\_brucelose](http://www.fundepecpr.org.br/?pag=brucelose_controle_da_brucelose) . Acesso em; 07 março de 2011.

HIRSH D. C., ZEE Y. C. **Microbiologia Veterinária** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 446 p.

KREEGER, T. J., MILLER, W., WILD, A. M., et al. **Safety and efficacy of Brucella abortus strain RB51 vaccine in captive pregnant elk** Journal of Diseases, 2000, v. 36, supl.3, p.447-483.

MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de Brucella abortus em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa em vacinal (B19) ou campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**. 2004. 77 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

OIE, OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **A animal health in the world**, 2011. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/BCL\\_S-EN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCL_S-EN.pdf) >. Acesso em: 21 fev. 2011.

PACHECO, W. A. **Excreção de Brucella abortus, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação com ciclo reprodutivo**. 2007. 70 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAIXÃO, T. A. **Modelo de infecção gastrointestinal e o papel do LPS, urease e sistema de secreção do tipo 4 da Brucella melitensis em camundongos**. 2009.65 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Patologia Animal - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PARSLOW, T. G., STITES, D. P., TERR. IMBODEN, J., B. **Imunologia Médica** 10 ed. Rio de Janeiro, 2004, 684 p.

PASQUALI, P., ADONE, R., GASBARRE L.C.; PISTOIA, C., et al **Mouse Cytokine Profiles Associated with Brucella abortus RB51 Vaccination or B. abortus 2308 Infection**. American Society for Microbiology – Infection and Immunity, 2001, v.69, n° 10, p.6541-6544.

POESTER, F. P. **Eficácia da vacina RB51 em novilhas**. 2006. 52p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

POESTER, F. P. **Manual de Zoonoses**. Programa de Zoonoses Região Sul. 2009, 1 ed. v.1, p. 9-20.

POESTER, F. P., FIGUEREDO 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** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2009, v.61, supl. 1, p.1-5

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

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B., K.; CARTER, G., R. **Clinical veterinary microbiology**. 4 ed. London: Wolfe, 1994, 648p.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B., K.; CARTER, G., R. DONNELLY, W., E., LEONARD, F., C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.

SOBESTIANSKY, J. ; BARCELLOS, D.; MORES, N. OLIVEIRA, S., J., CARVALHO, L.,F. **Patologia e clínica suína**. 1 ed., Lageado-RS: Ed. Cometa Ltda, 1993, 350 p.

SILVA, X., M., **Estudo multidimensional da brucelose em Minas Gerais e adequação de um modelo baseado em indivíduos para rebanhos bovinos**. 2007, 87 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais**. 1 ed., São Paulo: Ed. Manole, 1993, 1737 p.

VALENTE, L., C., M., VALE, S., M., L., R. **Análise espacial de medidas sanitárias de controle da brucelose e tuberculose bovinas**. 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, 2009.

VILLARROEL, M., GRELL, M., SAENZ, R. **Isolation and identification of Brucella abortus RB51 in human: first report in Chile**. Arch. Med. Vet. 2000, v. 32 n.1.