

BRUCELOSE EM BUBALINOS: UMA REVISÃO COM ÊNFASE AO SORODIAGNÓSTICO OFICIAL

Geraldo de Nardi Júnior¹
Márcio Garcia Ribeiro²
Lilia Paulin³
André Mendes Jorge⁴

RESUMO

O sorodiagnóstico é um dos principais procedimentos para o controle e profilaxia da brucelose, bem como na vigilância epidemiológica da doença, visto que pode ser utilizado em grandes rebanhos, possui custo acessível, boa sensibilidade e especificidade, além de ter padrão internacional. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT, deflagrado em 2001, preconiza que o sorodiagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas seja realizado a partir dos 24 meses de idade, nas bezerras vacinadas com a amostra B19 entre 3 a 8 meses de idade, utilizando as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e/ou fixação de complemento (FC). Tal recomendação faz-se necessária no intuito de evitar dificuldades na interpretação das provas sorológicas, decorrentes da presença de imunoglobulinas residuais de origem vacinal, que poderiam dificultar a diferenciação entre animais vacinados e infectados. As investigações sorológicas voltadas à brucelose bubalina no Brasil têm foco na comparação de animais reagentes frente às diferentes técnicas diagnósticas. No entanto, são escassos os estudos no país voltados ao acompanhamento sorológico de bezerras bubalinas vacinadas, conforme as recomendações do PNCEBT. O presente artigo revisou os principais aspectos da brucelose bubalina, com ênfase ao sorodiagnóstico oficial.

Palavras-chave: brucelose, bubalinos, diagnóstico, sorodiagnóstico.

BRUCELLOSIS IN BUFFALOES: A REVIEW WITH EMPHASIS ON OFFICIAL SERODIAGNOSIS

ABSTRACT

The serodiagnosis is one of the main procedures for control and prevention of brucellosis, as well as surveillance of the disease. It can be used in large herds, is affordable, has good sensitivity and specificity, in addition to international standards. The National Program for Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis - PNCEBT, which started in 2001, recommends that the serodiagnosis of brucellosis in water buffalo be performed from 24 months of age in calves vaccinated with B19 from 3 to 8 months of age, using the rose bengal plate test (RBPT), 2-mercaptoethanol (2-ME) and complement fixation (CF). This recommendation is necessary in order to avoid difficulties in interpretation of serological tests, due to the presence of residual immunoglobulin to vaccine strains that could hamper the differentiation between vaccinated and infected animals. Investigations on the serological

¹ Professor Ass. Doutor da Disciplina de Produção Animal do Curso de Tecnologia em Agronegócio da Faculdade de Tecnologia de Botucatu – Fatec-Bt (e-mail: gedenardijr@yahoo.com.br)

² Professor Doutor da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – DHVSP – FMVZ – UNESP/Botucatu/SP - Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu/SP, e-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br

³ Pesquisadora Científica do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo-SP.

⁴ Professor Doutor do Departamento de Produção Animal – FMVZ – UNESP – Lageado/Botucatu-SP.

brucellosis in water buffaloes in Brazil have focused on comparison of reactor animals in face of different diagnostic techniques. However, there are few studies in the country aiming serological monitoring of buffalo calves vaccinated according to recommendations of PNCEBT. This study reviewed the main aspects of brucellosis in water buffaloes, with emphasis on official serodiagnosis.

Keywords: brucellosis, buffaloes, diagnosis, serodiagnosis

BRUCELOSIS EN BÚFALO: UNA REVISIÓN CON ÉNFASIS EN EL SERODIAGNÓSTICO OFICIAL

RESUMEN

El serodiagnóstico es uno de los principales procedimientos para el control y profilaxis de la brucelosis, así como para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad, ya que puede ser utilizado en grandes rebaños, es de bajo costo, sensible, específico y está de acuerdo con la norma internacional. El Programa Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis - PNCEBT expuesto en 2001, dicta que el serodiagnóstico de la brucelosis en hembras de búfalo sea realizado a partir de los 24 meses de edad en las terneras vacunadas con la muestra B19 entre 3 y 8 meses de edad, utilizando las pruebas de antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) y/o fijación de complemento (FC). Tal recomendación se hace necesaria con el objetivo de evitar dificultades en la interpretación de las pruebas serológicas, derivadas de la presencia de inmunoglobulinas residuales de origen vacunal, que podrían dificultar la distinción entre animales vacunados e infectados. Las investigaciones serológicas de la brucelosis de búfalo en Brasil están enfocadas en la comparación de animales reactivos usando diferentes técnicas diagnósticas. Sin embargo, son escasos los estudios en el país con relación al seguimiento serológico de terneras de búfalo vacunadas conforme a las recomendaciones del PNCEBT. El presente artículo ha revisado los principales aspectos de la brucelosis de búfalo, con énfasis en el serodiagnóstico oficial.

Palabras clave: brucelosis, búfalos, diagnóstico, serodiagnóstico.

INTRODUÇÃO

A espécie bubalina apresenta como características peculiares a sua grande rusticidade e adaptabilidade a fatores climáticos, topográficos e solos pobres, somadas à dupla aptidão para produção de carne e leite, o que a torna boa alternativa para a produção de proteína animal, principalmente em países tropicais como o Brasil (1). O estreito contato com a espécie bovina, o padrão extensivo de criação dos bubalinos, o acesso contínuo desses animais a diversos tipos de ecossistemas, o hábito da espécie bubalina de banhar-se visando a termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e tanques, tornam esta espécie francamente exposta às infecções, incluindo a brucelose (2).

A brucelose em bubalinos e bovinos é reconhecida como doença infectocontagiosa causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*), caracterizada por manifestações clínicas da esfera reprodutiva e severos prejuízos aos produtores (3).

O sistema de manejo extensivo, as dificuldades do sucesso de programas de controle sanitário em países com grandes rebanhos e com extensa dimensão territorial, e o conceito equivocado de que os bubalinos são altamente resistentes às doenças que acometem os bovinos, são fatores que dificultam o controle da brucelose em bubalinos (2). Fosgate et al. (4) apontaram evidências de características distintas na cadeia epidemiológica da brucelose

em bovinos e bubalinos, que reforçam a necessidade de investigações específicas com a doença em bubalinos, visto que a maioria dos estudos enfoca a doença na espécie bovina.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT (5), deflagrado em 2001, preconiza que o sorodiagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas seja realizado a partir dos 24 meses de idade, nas bezerras vacinadas com a B19 entre 3 e 8 meses de idade, utilizando as provas do antígeno acidificado tamponado (corado com rosa bengala) [AAT], 2-mercaptoetanol (2-ME) e/ou fixação de complemento (FC). Tal recomendação faz-se necessária no intuito de evitar dificuldades na interpretação das provas sorológicas decorrentes da presença de imunoglobulinas (Ig) residuais de origem vacinal, que poderiam dificultar a diferenciação entre animais infectados e doentes.

À semelhança da espécie bovina, o sorodiagnóstico da brucelose bubalina se constitui em um dos principais procedimentos para controle, profilaxia e vigilância epidemiológica da doença, particularmente nos países que atingiram “status” de erradicação.

REVISÃO DA LITERATURA

Generalidades sobre a criação de bubalinos

A população mundial de bubalinos é da ordem de 170 milhões de cabeças. O rebanho bubalino da América do Sul é estimado em cerca de 4 milhões de cabeças, das quais 3,5 milhões encontram-se no Brasil, 150 mil na Venezuela, 50 mil na Argentina, 30 mil na Colômbia e o restante distribuído pelos demais países (6, 7).

Os bubalinos são pouco seletivos em relação às forrageiras e transformam alimentos, usualmente não consumidos por outros animais do mesmo porte, em proteínas nobres (1). Apresentam resultados satisfatórios quanto ao rendimento de cortes primários da carcaça e podem até mesmo superar os bovinos em determinados cortes, o que contribui muito para desmistificar a espécie e esclarecer a cadeia produtiva quanto ao seu real potencial de produção (8, 9).

O leite bubalino apresenta menor teor de colesterol, maior teor de gordura e de proteínas quando comparado ao leite bovino, além de maior rendimento na produção de queijo (particularmente a *mozzarella*) e manteiga (10). A produção de leite dos bubalinos é uma atividade que tem crescido nos últimos anos no Brasil, particularmente nos estados da região Sudeste, nos quais o leite é destinado, quase na sua totalidade, à produção de queijo *mozzarella*, que possui mercado assegurado e preços compensatórios, em virtude da qualidade nutricional e palatabilidade do produto (10).

No Brasil, os búfalos foram introduzidos em 1895 pela ilha de Marajó, importados da Austrália, do Egito, da Índia, da Itália e de países do sudoeste asiático. Na ilha de Marajó, os bubalinos encontraram condições ótimas para sua adaptação. Nas décadas seguintes foram introduzidos nas demais regiões do país, particularmente as que apresentam clima quente e úmido (1).

A maior parte do rebanho bubalino brasileiro concentra-se, atualmente, na região norte do país (65,9%) e o restante localiza-se nas regiões Nordeste (7,1%), Sudeste (7,5%), Sul (13,3%) e Centro-Oeste (6,2%), distribuído entre as raças Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (1,11). A despeito da escassez de estatísticas oficiais, a criação de bubalinos no mundo todo, em particular no Brasil, tem apresentado crescimento substancial, rompendo fronteiras, produzindo e se adaptando aos locais nos quais outras espécies de ruminantes não têm apresentado índices zootécnicos satisfatórios (11).

Baruselli (12) infere que os bubalinos podem ser criados no Brasil em regiões topográficas impróprias para bovinos, tais como várzeas inundáveis do rio Amazonas, baixadas litorâneas como o Vale do Ribeira, SP, Pantanal do Mato Grosso e banhados da região Sul.

As características peculiares da criação de bubalinos têm despertado o interesse dos pecuaristas no Brasil, fazendo com que, na última década, a bubalinocultura aumentasse 12,7% ao ano, ganhando crescente importância econômica na pecuária nacional, tanto na produção de carne quanto de leite, colocando o Brasil no cenário dos maiores rebanhos comerciais do mundo (11).

Impacto econômico da brucelose em bubalinos

A brucelose em animais de produção possui distribuição mundial e determina severos prejuízos de ordem econômica (13).

Na América Latina, as perdas econômicas devidas à brucelose são da ordem de 600 milhões de dólares/ano. No Brasil, estima-se que os prejuízos com a brucelose em bovinos e bubalinos sejam ao redor de 100 milhões dólares/ano (14).

Os prejuízos para a bubalinocultura com a brucelose são determinados principalmente por problemas da esfera reprodutiva (13), sendo a doença, principal causa de abortamentos em rebanhos bubalinos na Índia, na Itália e no Brasil (15).

As fêmeas das espécies bubalina e bovina provenientes de rebanhos livres de brucelose apresentam altas taxas de abortamentos (5-30%) na primoinfecção, e nascimentos de bezerros fracos ou doentes (15%). Com a cronificação da doença, as vacas apresentam redução na produção de leite (10 a 25%), diminuição na vida útil, aumento nas taxas de reposição (30%) e no número de repetições de cio. Destaca-se também que uma em cada cinco vacas acometidas desenvolve sub ou infertilidade, aumento no intervalo entre partos (8,5 meses) e redução no número de concepções. Em suma, a doença determina alterações em todos os parâmetros reprodutivos do plantel. Ademais, os países nos quais a doença cursa de forma endêmica possuem sérias restrições à exportação de animais, produtos e derivados (15-17).

Implicações em saúde pública

A brucelose é considerada doença ocupacional em humanos. O advento da pasteurização do leite representou redução significativa no impacto da doença em saúde pública. Porém, nos países emergentes (em desenvolvimento), a brucelose permanece como doença preocupante (3).

As infecções pelo gênero *Brucella* em humanos possuem forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com certo risco de exposição aos animais, tais como médicos veterinários, magarefes, produtores e laboratoristas (18). A *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) é reconhecida como a espécie mais patogênica para humanos, seguida por *Brucella suis* (*B. suis*), *Brucella abortus* e *Brucella canis* (*B. canis*). No entanto, a maioria das infecções em humanos é causada por *B. abortus*, visto que esta é a brucela mais difundida em animais de produção (3).

A doença em humanos por *B. abortus* se manifesta geralmente por sinais de febre intermitente, cefaléia, dor muscular e nas articulações. Em geral, as manifestações clínicas por *B. abortus* são mais brandas que as observadas nas infecções por *B. melitensis* ou *B. suis* (3, 7).

No Brasil, há poucas descrições de isolamento do micro-organismo em humanos, embora os registros disponíveis em investigações sorológicas sugiram altos níveis de exposição para os grupos de risco ou de vulnerabilidade, relacionados à ocupação profissional (19).

Nos humanos, a infecção pelo gênero *Brucella* pode ser provocada pelo contato direto com secreções de animais domésticos, fetos, placentas, secundinas, sangue e carcaças de animais infectados, bem como pelo consumo de produtos e subprodutos de origem animal (13).

O alto risco de infecção em humanos a partir dos bovinos e bubalinos tem sido frequentemente referido na literatura especializada, principalmente em indivíduos que possuem contato estreito com animais (3). Lacerda et al. (20) encontraram 11,8% de indivíduos sororreagentes em 59 trabalhadores de abatedouro, reforçando o comportamento ocupacional da doença.

O leite ingerido “in natura” ou sob a forma de derivados, sem pasteurização prévia, pode veicular o micro-organismo para os humanos (18). Botelho et al. (21) assinalaram alta ocorrência da infecção em humanos pela ingestão de leite de vaca e subprodutos “in natura”. Miyashiro (22), utilizando técnicas moleculares, detectou a presença de DNA do gênero *Brucella* em derivados de leite bovino comercializados de forma clandestina. Nesse estudo, o micro-organismo foi identificado em 29 (20,57%) dentre 141 queijos tipo minas frescal e 8 (15,69%) dentre 51 queijos minas meia cura.

As características físico-químicas peculiares do leite da espécie bubalina, que incluem maiores teores de proteína, gordura e caseína, propiciam a produção de derivados nobres como os queijos *mozzarella*, *provolone* e *ricota* (10). No entanto esses derivados podem ser elaborados sem prévia pasteurização ou outro tratamento térmico do leite, representando risco de contágio pelos humanos mediante o consumo desses produtos (18).

Brucelose em bubalinos

Propriedades gerais do gênero *Brucella*

A brucelose é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, que se apresentam microbiologicamente como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, desprovidos de cápsulas e não formadores de esporos (23). Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificados como micro-organismos catalase e oxidase-positivos, não fermentadores da lactose (24), uréase-positivos (reação em poucos minutos) e indol-negativos (25).

Micro-organismos do gênero *Brucella* são intracelulares. A patogenia e a natureza da resposta imune estão intimamente relacionadas à presença da bactéria no interior de fagócitos (26).

B. abortus é isolada entre 3 e 5 dias no ágar-*Brucella* ou no meio convencional de ágar enriquecido com sangue ovino ou bovino a 5% (desfibrinado), em condições de microaerofilia, a 37°C. A partir de três dias de incubação, as colônias apresentam 2 a 3 mm de diâmetro, são opacas, lisas e não hemolíticas (26). No cultivo microbiano de materiais suspeitos sujeitos à contaminação bacteriana secundária, são recomendados meios seletivos como o Farrel, constituído de vários antimicrobianos e antifúngicos impeditores para outros micro-organismos (26).

As brucelas são divididas em dois grandes grupos antigenicamente distintos, constituídos por amostras lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e amostras rugosas (*B. ovis* e *B. canis*) (27), diferenciadas com base nas características de primoincubação em meios de cultura e na estrutura da parede bacteriana (28).

As brucelas não apresentam espécie-especificidade. No entanto, mostram certa predileção por determinados hospedeiros. Dentre as brucelas lisas, *B. abortus* acomete preferencialmente bovídeos, enquanto *B. suis* e *B. melitensis* infectam, respectivamente, suínos e caprinos. Nas brucelas rugosas, *B. canis* é o principal agente causal da brucelose em canídeos e *B. ovis* em ovinos (28).

O gênero *Brucella* possui vários biotipos ou biovars. A diferenciação dos biotipos é fundamentada no requerimento de CO₂, na produção de H₂S, na multiplicação na presença de tionina e fucsina básica, na aglutinação com antissoros monoespecíficos (A, M, R) e na lise

por bacteriófagos (25, 26). Considera-se que *B. abortus* possua sete biotipos, embora outros tenham sido descritos até o momento, mas não reconhecidos na rotina de caracterização atual da espécie. Assume-se, também, que *B. suis* possua cinco biotipos e *B. melitensis* três, enquanto *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* não apresentariam biovariantes (25). Nielsen e Duncan (26) postularam que todas as espécies do gênero *Brucella* reconhecidas atualmente teriam derivado de *B. abortus* biotipo 2.

As biovariantes apresentam certas diferenças quanto à predileção pela infecção em determinadas espécies animais (28).

Em todo o mundo, a brucelose em bubalinos e bovinos é causada predominantemente pelo biotipo 1 (29). Estudo realizado em 37 países visando o isolamento de *B. abortus* das principais espécies domésticas constatou que, dentre 266 linhagens isoladas, 241 (90,6%) foram, predominantemente, os biotipos 1, 2 e 3 isolados de fêmeas bovinas, reforçando a espécie bovina como o principal reservatório de *B. abortus* (26).

No Brasil, até 1985, foram descritos os biotipos 1, 2 e 3 de *B. abortus*, e o biotipo 1 em isolados de *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis* (30).

Megid et al. (31) investigaram no país a caracterização de biotipos em quatro fetos bovinos e um bubalino. Foram identificados o biotipo 1 (um feto bovino e um feto bubalino), o biotipo 2 (um feto bovino) e o biotipo 3 (dois fetos bovinos), representando o primeiro registro nacional da caracterização de biotipo em linhagem de *B. abortus* isolada de feto bubalino, além de ressaltar o predomínio dos biotipos 1, 2 e 3 nos abortamentos nessas espécies animais.

Epidemiologia

A bactéria é transmitida principalmente por alimentos contaminados, água, leite ou pelo contato direto com animais infectados, que a eliminam por todas as vias, sobretudo pelo feto, descargas uterinas e leite (3). É encontrada em concentrações elevadas no material abortado e na placenta. Os bubalinos e os bovinos geralmente contraem a doença ingerindo alimentos e água contaminados por fetos abortados (13).

A brucelose possui distribuição mundial (13), exceto nos países que a erradicaram utilizando ações sistemáticas de controle, como EUA, Japão, França e outros países da Europa (32).

A brucelose tem sido descrita em bubalinos, bovinos, suínos, pequenos ruminantes, equinos e cães (30), assim como em roedores, lobos, cervídeos, gambás e outras espécies selvagens, embora não haja evidências de que essas espécies contribuam significativamente na ocorrência da doença nos rebanhos de animais de produção (13).

Os micro-organismos do gênero *Brucella* resistem às condições adversas do ambiente (26), incluindo extremos de pH, temperatura e luz solar direta (33). Podem resistir por seis meses ou mais na água, nos fetos abortados, em restos de placenta, nas fezes, na lã, no feno ou no solo (34). No leite e derivados, mantêm-se viáveis por vários meses (35). A fervura e temperaturas usuais de pasteurização destroem o micro-organismo (15). Desinfetantes clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeído (2%) e compostos fenólicos (2,5%) inativam o micro-organismo a partir de 15 minutos de exposição (36). O álcool (70%) destrói prontamente a bactéria (15). Sob ação do carbonato de cálcio (1:10), o micro-organismo é inativado após 30 minutos de exposição (35).

Patogenia

O ingresso da *Brucella* sp em rebanhos livres determina, inicialmente, elevado número de abortamentos (3). Nas gestações subsequentes ainda ocorre invasão do útero, mas a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente os abortamentos reincidem na

terceira prenhez. Após a fase aguda sobrevém a crônica, quando abortam somente os animais recém-introduzidos no rebanho ou novilhas de primeira cria (13, 29).

Entre os ruminantes domésticos, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, embora também possa ocorrer pelo contato direto com animais infectados ou pelo sêmen (3, 15). A transmissão vertical pode desencadear o estado de “portador latente”, fenômeno relatado em 1 a 9% das novilhas nascidas de fêmeas infectadas. Esses animais apresentam-se sorologicamente negativos ou com títulos oscilantes (26). As fêmeas latentes geram grandes dificuldades nas ações de controle da doença (29).

As brucelas penetram no organismo dos mamíferos pelas mucosas do trato digestório, genital, nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Em bubalinos e bovinos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. A partir do trato digestório, a bactéria é carregada aos linfonodos mesentéricos e fagocitada, principalmente por macrófagos. Nos fagócitos, podem permanecer quiescentes por vários meses. A bacteremia ocorre por cerca de duas semanas nos bovinos e bubalinos, com o micro-organismo livre no plasma ou no interior dos macrófagos (26).

O micro-organismo possui tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, como baço, fígado e linfonodos (37). A multiplicação da bactéria é estimulada pelo produto da degradação do eritritol, reconhecido como um açúcar presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores femininos e masculinos. O eritritol atinge grandes concentrações no útero gravídico, principalmente nos líquidos fetais, nos placentomas e no tecido córion-alantoideano (38). A presença do eritritol no útero gravídico justificaria, em parte, a brucelose como doença da esfera reprodutiva em certas espécies, incluindo os bubalinos (39).

A produção do eritritol cresce na razão direta da evolução da gestação, porém apresenta alta concentração até os cinco meses da prenhez (40). Tal fato sugere que outras substâncias possam estimular a multiplicação das brucelas, potencializando a ação do micro-organismo na placenta e/ou feto (39).

A multiplicação de *B. abortus* nos placentomas determina necrose, lise das vilosidades e subsequente descolamento do cotilédone e da carúncula. Somente a lesão placentária é suficiente para desencadear o sofrimento fetal por má absorção e oxigenação, culminando com o abortamento. No entanto, o micro-organismo frequentemente invade o feto, determinando infecções em órgãos como pulmão, fígado e baço. Paralelamente, certas fêmeas podem levar a gestação a termo, gerando o nascimento de bezerros doentes e debilitados, que podem vir a óbito em poucos dias. O processo cicatricial e o depósito de fibrina nos placentomas resultam em aderências da placenta nas gestações subsequentes, que determinam altas taxas de retenção de placenta em rebanhos nos quais a doença cursa de forma crônica (3). Ademais, as bubalinas acometidas podem apresentar quadros de metrite, subfertilidade e/ou infertilidade (37).

Após o abortamento, a bactéria migra para outros órgãos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, podendo determinar mastite crônica ou manter-se quiescente nos linfonodos até a gestação subsequente (41). Os animais infectados eliminam a bactéria em grandes quantidades pelos produtos do abortamento, no parto ou pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos suscetíveis. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e pode persistir por vários meses (3).

Nos touros, a brucela se instala principalmente nos órgãos acessórios do sistema reprodutivo, particularmente na vesícula seminal, podendo ser eliminada pelo sêmen. No entanto, a transmissão do micro-organismo pela monta natural é epidemiologicamente menos frequente se comparada à via oral (42).

Manifestações Clínicas

Na espécie bubalina, as manifestações clínicas da brucelose estão relacionadas principalmente à esfera reprodutiva, causadas predominantemente pela infecção por *B. abortus*. Essa espécie de brucela determina placentite necrótica, morte fetal e abortamentos geralmente no terço final do período gestacional. A gestação poderá também vir a termo, gerando produtos fracos, que poderão morrer nas primeiras semanas (43). Metrites, retenções placentárias e higroma articular ocorrem como sequela da infecção por *B. abortus* (17).

Nos touros, a patogenicidade da bactéria está relacionada à lesão testicular e das glândulas acessórias, manifestada por quadros de orquite, epididimite e vesiculite (13), levando comumente os animais infectados à subfertilidade e/ou infertilidade, somados aos baixos indicadores reprodutivos do rebanho (44).

Controle

A capacidade de sobrevivência das brucelas em condições naturais é elevada se comparada à de outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambientes úmidos, ao abrigo da luz solar direta, pH próximo ao neutro e na presença de matéria orgânica. A bactéria pode permanecer viável por até seis meses em pastos nos quais ocorreram casos de abortamento (18). Em geral, a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento e a adoção do vazio das instalações (no mínimo seis meses) são recomendadas para evitar a transmissão para animais suscetíveis nas propriedades em que a doença cursa de forma endêmica (5, 18).

Embora os mecanismos de transmissão da brucelose bovina e bubalina sejam semelhantes, certas particularidades do comportamento da criação de bubalinos devem ser consideradas previamente ao estabelecimento de programas de controle. A criação bubalina é quase que exclusivamente extensiva, com a utilização de grandes áreas, proporcionando acesso contínuo a diversos tipos de ecossistemas. Ademais, são animais fortes, possuem hábitos migratórios e gregários. Movimentam-se principalmente à noite pelos pastos, rios e aguadas. Na procura de alimento ou água, podem invadir outros pastos e entrar em contato com outros grupos de animais, aumentando a possibilidade de difusão da doença. O hábito dos bubalinos de banharem-se visando à termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e açudes, contribui para a exposição da espécie a determinados micro-organismos, entre os quais as brucelas, visto que esses ambientes permitem a sobrevivência da bactéria (4).

Em todo o mundo, os países que alcançaram “status” de controle ou erradicação da brucelose fundamentaram seus programas na adoção de medidas semelhantes às preconizadas pelo Brasil no PNCEBT, particularmente pela vacinação sistemática das bezerras, adoção de quarentena e medidas higiênico-sanitárias nos rebanhos, realização de diagnóstico sorológico continuado nos plantéis, aliado ao abate sanitário dos animais reagentes (5, 43).

Diagnóstico

O isolamento de *B. abortus* dos fetos abortados, da placenta e do leite é considerado o método mais fidedigno no diagnóstico individual da brucelose. No entanto, a dificuldade de isolamento do micro-organismo em rebanhos dificulta o uso do diagnóstico microbiológico como método de controle massal da doença (32).

O surgimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem facilitado o diagnóstico direto das doenças infecciosas, pela demonstração do ácido nucleico do agente, surgindo como alternativa ao diagnóstico microbiológico (45). A tecnologia de PCR tem sido aplicada à detecção de contaminação por *Brucella* em alimentos, principalmente leite e queijos frescos, que constituem importantes

vias de transmissão da brucelose em humanos. Essa técnica também tem sido empregada em amostras isoladas de material clínico como sangue total, secreções, sêmen e abortamentos, permitindo, inclusive, o diagnóstico da doença nos fetos ainda que o agente não esteja mais viável para o isolamento microbiano (45).

Embora a PCR seja promissora, a padronização de métodos de extração, infraestrutura, equipamentos e conhecimentos específicos ainda requerem tempo para que a técnica possa ser incluída na rotina dos laboratórios de diagnóstico (46).

Neste contexto, devido às limitações dos procedimentos laboratoriais que se apoiam no cultivo microbiano do gênero *Brucella*, o diagnóstico da brucelose bubalina tem sido fundamentado na investigação de Ig anti-*B. abortus* no soro sanguíneo e no leite (47).

A persistência de Ig séricas pós-vacinais e a ocorrência de reações inespecíficas nos métodos sorológicos convencionais têm-se constituído no principal entrave no sorodiagnóstico da doença em bubalinos. Dentre estas reações inespecíficas incluem-se as reações cruzadas entre as linhagens lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) ou com outros micro-organismos Gram-negativos, quais sejam dos gêneros *Pasteurella*, *Francisella*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Yersinia* (0:9) (32).

Tanto nos humanos como nos animais, a infecção natural por *Brucella* sp estimula o aparecimento quase simultâneo de Ig das classes IgM e IgG. Durante a evolução da doença ocorre declínio e tendência do desaparecimento dos níveis de IgM, enquanto IgG persiste em níveis elevados. O desaparecimento de IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção (47).

Em contraste, bubalinos e bovinos vacinados com a cepa padrão B19 apresentam predomínio da classe IgM, que mostram concentrações máximas por volta do 13º dia após a vacinação, enquanto a classe IgG - particularmente a subclasse IgG1 - é observada em pequenas quantidades, com picos máximos entre o 28º e o 42º dia pós-vacinais (42). Ribeiro et al. (48), no Brasil, acompanharam o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bovinas vacinadas entre três e oito meses de idade com a dose padrão de B19 e observaram títulos sorológicos máximos na prova de soroaglutinação rápida em placa (SAR) - que detecta ambas IgM e IgG - entre o 14º e o 42º dias pós-vacinais e, no 2-ME - que prioriza reações com IgG - , entre o 28º e o 42º dia, com ausência de animais reagentes aos 308 dias após a vacinação.

O diagnóstico sorológico da brucelose em bubalinos e bovinos no Brasil foi modificado pela Instrução normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (5). O PNCEBT preconiza as provas do AAT, 2-ME e FC para o diagnóstico sorológico da brucelose bubalina e bovina. O AAT é recomendado como método de rotina (triagem), enquanto o 2-ME e a FC, como provas confirmatórias, embora somente a FC seja preconizada para o trânsito e comércio internacional de animais (5).

Após a deflagração do PNCEBT no Brasil, em 2001, a prova do AAT tem sido utilizada como método de rotina, em substituição à prova clássica de soroaglutinação rápida em placa, em virtude da boa sensibilidade e especificidade do AAT, apesar da detecção preferencialmente da classe IgG nesta prova, fato que limita a identificação de animais no início de infecção (5).

Na prova do AAT, a presença de qualquer reação de aglutinação classifica o animal como reagente. A critério do médico veterinário, os animais reagentes no AAT poderão ser submetidos às provas confirmatórias 2-ME ou FC. A prova do AAT é constituída do antígeno a 8%, realizada em placa de vidro, com leitura em quatro minutos de reação. A acidificação do antígeno a pH 3,65 limita a aglutinação da classe IgM, ao contrário da IgG, que mantém a capacidade aglutinante nesse pH ácido (42).

A prova de 2-ME possui boa sensibilidade e alta especificidade, e se caracteriza pela detecção de IgG, considerada a principal classe de Ig presente em animais infectados por *B.*

abortus. A reação de 2-ME é realizada em tubos mantidos em estufa, com antígeno em concentração de 0,045% e leitura com 48 horas. O composto 2-ME rompe as pontes dissulfídicas (enxofre) dos pentâmeros de IgM, resultando em monômeros de IgM que perdem a capacidade aglutinante, priorizando assim as reações com IgG, que se mantém inalterada na presença do radical 2-ME (42).

A prova de fixação de complemento fundamenta-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento. Esta prova apresenta boa sensibilidade, alta especificidade e detecta preferencialmente IgG, principalmente da subclasse IgG₁, que predomina em animais infectados (43). A prova de FC é realizada em placas em “U” com 96 poços, com leitura em uma hora. O método é mais laborioso se comparado a AAT e 2-ME. Desta forma, é realizado em número restrito de laboratórios, visto que exige controle rígido de todos os reagentes (antígeno, sistema hemolítico) (24). A técnica detecta precocemente IgG₁ no soro em torno do 14^o dia e também é capaz de revelar casos crônicos nos quais os níveis de IgM praticamente desapareceram e os níveis de IgG₁ são baixos, devido ao baixo limiar de detecção da prova (15).

Os estudos realizados no Brasil com a brucelose em bubalinos praticamente estão restritos à comparação de reações dos animais em diferentes métodos sorológicos (49).

Inquérito sorológico da brucelose em bubalinos no Estado de Goiás revelou 17,31% de animais positivos e 15,82% de suspeitos, em 199 amostras de soros examinadas pela prova de soroaglutinação em placa (50). Sandoval et al. (51) investigaram 992 soros provenientes de rebanhos bubalinos do Estado de São Paulo e encontraram prevalência de 4,33% e 5,69% para brucelose, respectivamente, nas provas de soroaglutinação rápida em placa e “card test”.

Feitosa et al. (52) relataram 21,92% de animais reagentes em 8.845 bubalinos do Estado de São Paulo, utilizando a prova do AAT, e salientaram que a frequência de bubalinos reagentes foi superior a de estudos similares em bovinos.

Na região do Vale do Ribeira, SP, Mathias et al. (53) assinalaram 10,39% de bubalinos reagentes para brucelose em 462 animais, utilizando a prova de FC.

Alternativamente, tem-se investigado também o uso de vacinas com dose reduzida de *B. abortus*, no intuito de minimizar a interferência dos títulos residuais pós-vacinais no diagnóstico sorológico. No Brasil, Kuchembuck (54) vacinou bubalinas adultas, experimentalmente, utilizando dose reduzida da vacina B19 (2 x 10⁹ bactérias/dose, por instilação conjuntival). O autor concluiu que essa prática evitou a disseminação da doença, limitou a ocorrência de manifestação clínica nas fêmeas e reduziu o número de animais reagentes ao longo de seis meses após a vacinação. Porém salientou a necessidade de estudos visando avaliar o declínio dos títulos residuais em bubalinas vacinadas, que poderiam interferir com as provas sorológicas convencionais preconizadas para o diagnóstico no país.

São praticamente incipientes as investigações de acompanhamento do perfil sorológico de bubalinas vacinadas com B19 no Brasil. Estudos dessa natureza podem determinar a interferência provocada por Ig de origem vacinal nos testes sorológicos recomendados no PNCEBT (49), fornecendo subsídios à avaliação continuada das ações de controle e profilaxia, necessárias para o sucesso do programa.

A vacinação com a cepa atenuada B19 é recomendada para bezerras entre 3 e 8 meses de idade, visto que esses animais ainda não são sexualmente maduros, impedindo a patogenicidade da cepa vacinal nas fêmeas vacinadas. Ademais, as bezerras vacinadas tornam-se negativas ao atingirem a idade de cobertura (28). King e Frank (55) afirmaram que 90% das fêmeas vacinadas entre 3 e 8 meses resultaram negativas em testes sorológicos convencionais após nove meses da vacinação. Portanto, a idade das fêmeas na época da vacinação é um fator limitante no uso da vacina B19, visto que em animais vacinados após oito meses de idade os anticorpos oriundos da vacinação não são diferenciados dos induzidos por linhagens de campo nas provas sorológicas de rotina (28).

Domingues et al. (56), no Brasil, acompanharam por 240 dias o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bubalinas, entre 3 e 8 meses de idade, vacinadas com a dose padrão de B19, e com dose reduzida (750×10^6 bactérias/dose, via subcutânea). Os autores observaram que 7,7% dos animais vacinados com a dose padrão ainda apresentavam título 100 na soroaglutinação rápida em placa aos 240 dias pós-vacinais, enquanto 45% dos animais vacinados com dose reduzida possuíam título 25 no mesmo período.

Ribeiro et al. (49) investigaram o perfil de aglutininas anti-*B. abortus* em bezerras bubalinas vacinadas entre 3 e 8 meses com a dose padrão de B19. Foi observado que os títulos sorológicos máximos nas provas convencionais de soroaglutinação rápida em placa e 2-ME ocorreram entre o 15^o e o 45^o dia após a vacinação e, na média, as fêmeas não apresentaram títulos na prova de 2-ME após dez meses de aplicação da vacina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A brucelose, por ser zoonose e causar prejuízos à produção de carne e leite, tornou-se alvo de programas de controle e erradicação em vários países. Esses programas geralmente não fazem distinção entre as espécies bovina e bubalina, adotando estratégias comuns para ambas. No entanto, certas características peculiares dos bubalinos requerem estudos específicos voltados à espécie, notadamente quanto à epidemiologia, ao diagnóstico e às ações de controle e profilaxia.

O diagnóstico microbiológico é fidedigno na brucelose em bubalinos, mas apresenta como inconvenientes a dificuldade de isolamento e limitações de uso massal. A caracterização molecular da *Brucella* é promissora, especialmente na identificação do microrganismo em leite e abortamentos.

Desta forma, o sorodiagnóstico permanece como técnica factível na rotina da maioria dos laboratórios em todo mundo, de custo acessível, padronizada, com boa sensibilidade e especificidade, servindo como um dos principais procedimentos para controle, profilaxia e vigilância epidemiológica da doença em bubalinos.

REFERÊNCIAS

1. Nardi Júnior G. Perfil de anticorpos anti-*Leptospira* spp em búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dois tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
2. Nardi Júnior G, Genovez ME, Ribeiro MG, Castro V, Jorge AM. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnostic of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. *Braz J Microbiol.* 2007;38:363-8.
3. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3^a ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2003.
4. Fosgate GT, Adesiyun AA, Hird DW, Johnson WO, Hietala SK, Schrig GG, et al. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Am J Vet Res.* 2002;63:1598-605.
5. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina. Brasília; 2009 [cited 2009 Jul 8]. Available from: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>.

6. Food and Agriculture Organization. Bovine brucellosis. Health, diseases cards. [cited 2003 Maio 23]. Available from: <<http://www.fao.org>>.
7. Paulin LMS. Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
8. Jorge AM. Desempenho em confinamento e características de carcaça em bubalinos. In: Barnabé VH. Bubalinos: sanidade, reprodução e produção. Jaboticabal: Funep; 1999. p.51-67.
9. Jorge AM. Produção e qualidade da carne bubalina. In: Franzolin Neto R, editor. Anais do 2º Simpósio Paulista de Bubalinocultura; 2001, Pirassununga. Pirassununga: USP; 2001. p.1-47.
10. Andrighetto C. Efeito da monensina sódica na produção, composição do leite e escore de condição corporal de búfalas Murrah no início da lactação [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
11. Jorge AM. Produção de carne bubalina. Rev Bras Reprod Anim. 2005;29:84-95.
12. Baruselli PS. Manejo reprodutivo de bubalinos. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento; 1993.
13. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2007.
14. Folha de São Paulo. Jornal a Folha de São Paulo. Saiba mais sobre a doença do aborto da vaca, a brucelose. São Paulo; 2000 [cited 2000 Set 2]. Available from: <<http://www.folhaonline.com.br>>.
15. Paulin LMS, Ferreira Neto JS. O combate à brucelose bovina: situação atual. Jaboticabal: Editora Funep; 2003.
16. Joint Food Agricultural Organization. Expert committee on brucellosis. Genebra: World Health Organization; 1986.
17. Láu HD. Doenças em búfalos no Brasil, diagnóstico, epidemiologia e controle. Brasília: Embrapa; 1999.
18. United States Department of Agriculture. National Center for Animal Health Programs. Facts about brucellosis. New Jersey; 2009 [cited 2009 Ago 10]. Available from <<http://www.aphis.usda.gov>>.
19. Homem VSF, Heinemann MB, Moraes ZM, Veiga JB, Láu HD, Tourrand JF, et al. Some zoonosis in the Eastern Amazon. Case of Uruará, Brazil. In: Proceedings of the 10th International Congress on Animal Hygiene; 2000, Netherlands. Netherlands: ISAH; 2000. p.204-10.

20. Lacerda LM, Alves LMC, Mathias LA, Rodrigues ALB, Almeida FM. Brucelose em trabalhadores de matadouros do município de São Luís, MA. Hig Aliment. 1997;14:62-5.
21. Botelho AP, Mota RA, Silva LBG, Santos Filho AS, Coelho RMS, Lima ET. Recuperação de *Brucella abortus* do leite 'in natura' procedente de vacas soropositivas dos municípios de Pedra e Venturosa-PE: aspectos de saúde pública. Hig Aliment. 1990;14:72-7.
22. Miyashiro S. Presença de DNA de *Brucella abortus* em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa vacinal (B19) ou de campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2004.
23. Nielsen K, Smith P, Widdison J, Gall D, Kelly L, Kelly W, et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. Vet Microbiol. 2004;100:25-30.
24. Paulin LMS. Brucelose. Arq Inst Biol. 2003;70:239-49.
25. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe; 2005.
26. Nielsen K, Duncan JR. Animal brucellosis. Boca Raton: CRC Press; 1990.
27. Metcalf HE, Luchsinger DW, Ray WC. Brucellosis. In: Beran GW, Steele JH. Handbook of zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.9-39.
28. Adans LG. Development of live brucella vaccines. In: Advances in brucellosis research. Austin: Texas A&M University Press College Station; 1990. p.251-76.
29. Bishop GC, Bosman PP, Herr S. Bovine brucellosis. In: Coetzer JAN, Thomson GR, Tustin RC. Infectious diseases of livestock. Austin: Texas A&M University Press College Station; 1994. p.1053-66.
30. Garcia-Carrillo C. Animal and human brucellosis in the Americas. Paris: Office International des Epizooties; 1990.
31. Megid J, Albert D, Fagliari JJ, Paes AC, Listoni FJP, Pinto MRA, et al. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. Vet Rec. 2005;156:147-8.
32. Molnár L, Molnár E, Tury E, Souza JS. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. Rev Bras Med Vet. 1997;19:157-62.
33. Nielsen K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. Arch Med Vet. 1995;27:9-17.
34. Lucero NE, Ayala SM, Ecobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect. 2008;136:496-503.

35. Omer MK, Skjerve E, Holstad G, Woldehiwet Z, Macmillan AP. Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. *Epidemiol Infect.* 2000;125:447-53.
36. Castro AC, González RS, Prat IM. Brucellosis: uma revisão pratica. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2005;39:203-16.
37. Bathke W. Brucellosis. In: Beer J. Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca; 1988. p.144-60.
38. Paulin LMS, Ferreira Neto JS. Artigo de revisão: brucelose em búfalos. *Arq Inst Biol.* 2008;75:389-401.
39. Kindahl H, Kornmatitsuk B, Gustafsson H. The cow in endocrine focus before and after calving. *Reprod Domest Anim.* 2004;39:217-21.
40. Samartino LE, Enright F, Baker R. Is the erythritol the cause of abortion by brucellosis? In: Anais do 15º Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias; 1996, Campo Grande. Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias; 1996. p.34.
41. Grasso-Paulin LMS. O combate à brucelose bovina [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2000.
42. Sutherland SS. Immunology of bovine brucellosis. *Vet Bull.* 1980;50:359-68.
43. Grasso LMPS, Cardoso MV. Brucelose bovina. *Biológico.* 1998;60:71-9.
44. Nicoletti P. Brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: Morrow DA. Current therapy in theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986. p.271-4.
45. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002;90:435-46.
46. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4:115-23.
47. Casas Olascoaga R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. *Zoonosis.* 1976;18:107-41.
48. Ribeiro MG, Spago N, Ratti JR, Megid J. Perfil sorológico anti-*Brucella abortus* em bezerras vacinadas com amostra B19. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1997;49:137-50.
49. Ribeiro MG, Megid J, Nardi Junior G, Kuroda BS, Jorge AM. Perfil de aglutininas anti-*Brucella abortus* em provas de triagem e confirmatórias, em bezerras búfalas vacinadas com a B19. In: Anais do 28º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 2001, Salvador. Salvador: SBMV; 2001. p.160.
50. Costa EO, Cury R, Rocha UF. Sobre a ocorrência da brucelose em búfalos no Estado de Goiás. Inquérito sorológico. *Biológico.* 1973;6:162-4.

51. Sandoval LA, Arruda NM, Teruya JM, Giorgi W, Amaral LBS, Mazanti MT. Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo. *Biológico*. 1979;45:209-12.
52. Feitosa MH, Bitar CR, Gomes SP. Brucelose: levantamento sorológico no estado de São Paulo no período de 1977 a 1987. *Vet Zootec*. 1991;3:9-15.
53. Mathias LA, Girio RJS, Del Fava C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesqui Vet Bras*. 1998;18:111-4.
54. Kuchembuck MRG. Estudo imunológico clínico do uso em dose reduzida da vacina contra brucelose (amostra B19) em búfalas adultas [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1983.
55. King NB, Frank NA. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *J Am Vet Med Assoc*. 1961;131:100-3.
56. Domingues PF, Langoni H, Padovani CR, Fessel YN. Pesquisa de aglutininas anti-*Brucella* sp em soros de bezerras bubalinas vacinadas com dose padrão e reduzida de amostras B-19. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1992;44:491-500.

Recebido em: 11/02/10

Aceito em: 19/03/12