

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS

ADRIANA AGOSTINI BARBOSA

**USO DA VACINA CEPA RUGOSA CONTRA BRUCELOSE EM  
FÊMEAS BOVINAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO**

Alfenas – MG

2014

ADRIANA AGOSTINI BARBOSA

**USO DA VACINA CEPA RUGOSA CONTRA BRUCELOSE EM  
FÊMEAS BOVINAS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Mestrado Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas – MG

2014

Barbosa, Adriana Agostini

Uso da vacina cepa rugosa contra brucelose em fêmeas bovinas em diferentes estágios de gestação.—Adriana Agostini Barbosa, 2014.

55 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Carvalho Fernandes

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária- Reprodução ,Sanidade e Bem Estar Animal- Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2014.

1.Aborto 2. Vacinação 3. Brucelose 4. Gestação

I. Título

CDU : 636.082(043)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador e aos funcionários da fazenda que sempre me ajudaram com muita paciência e dedicação.

Aos colegas de mestrado pelo companherismo e boa prosa.

À Deus por tudo...

## RESUMO

BARBOSA, Adriana Agostini. **Uso da vacina cepa rugosa RB51 contra brucelose em fêmeas bovinas gestantes em diferentes estágios de gestação.** Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: UNIFENAS, 2014. Dissertação (Mestrado em Reprodução, sanidade e Bem Estar Animal).

Cepas de *Brucella abortus* de campo, assim como as vacinas feitas com antígenos de partes de células lisas S19 (LPS), induzem um mesmo anticorpo específico, que a torna difícil de distinguir animais vacinados e animais infectados. Para evitar a interferência sorológica no diagnóstico se usa uma vacina que não induz anticorpos contra o polissacárido "O" (O-LPS), isto é, uma cepa rugosa não indutora de anticorpos aglutinantes. A cepa de *Brucella abortus* não indutora de anticorpos aglutinantes foi isolada na década de 1980 e a vacinação com essa, confere proteção sem interferir nos métodos sorológicos usuais, mesmo em vacas adultas. Alguns trabalhos indicam que a cepa rugosa é segura quando inoculado em fêmeas gestantes, porém apenas na dose reduzida. A utilização em doses normais para vacas gestantes não é recomendada. Esta situação pode levar à possíveis falhas de imunização, por não ser possível vacinar esta categoria animal de relevante importância na disseminação da doença. As informações da literatura não permitem afirmar se esta vacina, em doses normais é segura para fêmeas bovinas gestantes. O objetivo deste estudo foi determinar a segurança da vacinação com a dose completa de uma vacina produzida com cepa rugosa ( $1,0-3,4 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônias - UFC), Brucelina Rebeccin™ – Vallée – Brasil, em fêmeas gestantes nos diferentes estágios de gestação. O estudo foi desenvolvido no Estado de Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 96 fêmeas bovinas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) soronegativas ao teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), em três períodos gestacionais (terço inicial: TI, médio: TM e final: TF), divididas aleatoriamente em dois grupos, tratado e controle (T ou C), constituindo 6 tratamentos com 16 animais. Após a aplicação da vacina foram mantidas juntas, em pastagem de capim brachiaria com suplementação mineral. Comparou-se os grupos utilizando o teste de  $X^2$  as seguintes variáveis: gestações à termo; bezerros vivos aos 60 dias pós-parto e a ocorrência de bezerros soropositivos neste período. Considerou-se como significância 5% de probabilidade. Não foram observadas diferenças entre tratamentos em cada um dos períodos, nem quando os períodos foram analisados em conjunto para gestações à termo (87,5; 87,5; 93,8; 93,8, 81,3 e 100%) nem para bezerros vivos aos 60 dias (75,0; 87,5; 87,5; 87,5, 81,3 e 93,8%) -  $p > 0,05$ , para TI-C, TM-C, TF-C, TI-T, TM-T e TF-T,

respectivamente). Não foi encontrado nenhum animal soropositivo aos testes usuais de detecção (soroaglutinação rápida) aos 60 dias de idade. Conclui-se que a aplicação da vacina Brucelina Rebeccin® em qualquer fase da gestação é segura para fêmeas bovinas, pois não provoca perdas da gestação ou interfere na viabilidade dos bezerros após o nascimento. Adicionalmente, a vacinação das fêmeas gestantes com o produto não leva à formação de anticorpos que possam ser detectados nos testes usuais de diagnóstico para brucelose.

**Palavras-Chave:** Aborto, vacinação, brucelose, gestação.

## ABSTRACT

BARBOSA, Adriana Agostini. Use of vaccine against brucellosis cepa rough in female bovine in different stages of pregnancy. Advisor: Carlos Antônio Fernandes de Carvalho. Alfenas: UNIFENAS, 2014. Dissertation (MSc in Reproduction sanity and animal welfare).

Field strains of *Brucella abortus*, as well as the vaccines made of antigens from portions of S19 lipopolysaccharides (LPS), induce the same specific antibody, what makes very difficult to distinguish by means of serologic tests vaccinated animals and those infected. To avoid serologic interference with diagnosis it is used a vaccine that does not induce O-lipopolysaccharide (O-LPS) antibodies, that is, a rough strain that does not induce agglutinating antibodies. A *Brucella abortus* strain that does not induce agglutinating antibodies was isolated in the 80's and, when used as a vaccine, offers protection without interfering with usual serologic methods, even in adult cows. Some works indicate that the rough strain is safe when inoculated in pregnant females, but only when reduced dose as used. The use of normal doses in pregnant cows is not recommended, what leads to potential failures of immunization programs. Literature information does not allow for stating if such vaccine at normal doses is safe when administrated to pregnant cows. The aim of this study was to evaluate the safety of a full dose vaccine made of a rough strain ( $1.0-3.4 \times 10^{10}$  colony forming units - CFU) (Brucelina Rebeccin™ – Vallée – Brazil) in pregnant cows at different stages of pregnancy. The study was conducted in the state of Minas Gerais, Brazil. The experiment used 96 female bovines of mixed breed (*Bos taurus* x *Bos indicus*), nulliparous and multiparous, at three different pregnancy stages (initial stage: TI, middle stage: TC, and final stage: TF), randomly assigned to two groups (treated and control – T or C), composed of 6 treatments with 16 animals. After vaccine administration, the animals were kept together on *brachiaria* grass pastures with mineral supplementation. The following variables werw compared using  $X^2$  test of the following variables: Percentage of calves born, percentage of live calves 60 days after delivery and number of seropositive cows and calves during such period. A 5% chance was deemed as significant. No differences were seen between treatments in each period or when periods were analyzed all together for the percentage of calves born alive and healthy (87.5; 87.5; 93.8; 93.8. 81.3 and 100%) or for the calves alive 60 days after delivery (75.0; 87.5; 87.5; 87.5. 81.3 and 93.8%) -  $p > 0.05$  for TI-C, TM-C, TF-C, TI-T, TM-T and TF-T, respectively). No animal was found to be seropositive in the usual detection tests (fast seroagglutination) at 60 days of

age. It was concluded that the administration of vaccine Brucelina Rebeccin™ at any pregnancy stage is safe for bovine females, since it does not lead to fetal losses nor interferes with calves' feasibility after birth. Additionally, the use of such product in the vaccination of pregnant cows does not lead to the formation of antibodies that can be detected by the usual diagnostic tests for brucellosis in calves and cows

Key words: Abortion, vaccination, brucellosis, pregnancy

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Prevalência de animais positivos nos diferentes Estados da Confederação	18
Figura 2 -	Resposta dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de <i>Brucella abortus</i> ou vacinados com B19	24
Figura 3 -	Resposta a longo termo dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de <i>Brucella abortus</i>	25
Figura 4 -	Resposta a longo termo dos principais isotipos de anticorpos em bovinos vacinados com a amostra B19 de <i>Brucella abortus</i>	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das fêmeas em diferentes fases de gestação e tratamento	49
Tabela 2	Número e percentual de gestações à termo em diferentes grupos e períodos de gestação	50
Tabela 3	Número total de bezerros vivos aos 60 dias de idade, provenientes de fêmeas soronegativas que receberam tratamentos em diferentes períodos da gestação	52

## Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Histórico e Definição .....	14
2.2. Etiologia .....	14
2.3. Epidemiologia .....	16
2.3.1. Situação Mundial .....	16
2.3.2. Situação Brasileira .....	17
2.4. Perdas Econômicas .....	19
2.5. Resistência .....	19
2.6. Mecanismos de Transmissão .....	20
2.7. Patogenia.....	21
2.8. Sinais Clínicos e Lesões.....	22
2.9. Resposta Imune na Infecção e Vacinação.....	23
2.10. Diagnóstico .....	25
2.10.1. Métodos diretos .....	25
2.10.2. Métodos indiretos ou sorológicos.....	26
2.10.3. Testes de Triagem .....	27
2.10.4. Teste do anel em Leite (TAL).....	27
2.10.5. Testes Confirmatórios .....	28
2.10.6. Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) .....	28
2.10.7. Teste de soroaglutinação.....	28
2.10.8. Fixação de complemento (FC).....	28
2.10.9. Teste de polarização fluorescente (FPA).....	28

2.10.10. Teste de Elisa indireto e Teste de Elisa competitivo .....	<b>29</b>
2.11. CONTROLE .....	<b>29</b>
2.11.1. Vacinas .....	<b>31</b>
2.11.1.1. Vacina B19.....	<b>31</b>
2.11.1.2. Vacina não indutoras de anticorpos aglutinantes (amostra RB 51) .	<b>33</b>
2.12. DOENÇA NO SER HUMANO .....	<b>34</b>
3. OBJETIVOS.....	<b>35</b>
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	<b>36</b>
5. CAPÍTULO 1: Manuscrito a ser enviado á revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.....	<b>45</b>
6. Anexos – Normas para Publicação – Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Erradicação da brucelose, uma importante zoonose está em curso em várias partes do mundo há mais de 50 anos, e um importante componente envolvido nestes programas de erradicação são os protocolos de vacinação. A *Brucella abortus* de cepas de campo assim como as vacinas feitas com antígenos de partes de células lisas S19 (LPS), induzem um mesmo anticorpo específico como resposta, que a torna muito difícil de distinguir entre animais vacinados e animais infectados pela maioria dos testes sorológicos.

A abordagem para evitar a interferência sorológica no diagnóstico é por meio de uma vacina que não induz anticorpos contra o polissacarídeo "O" (O-LPS). É uma estirpe mutante com características particulares desprovida desse polissacarídeo, chamada inicialmente de RB51 que foi produzida a partir de uma cepa pouco virulenta da *B. abortus* 2308 por várias passagens em meios suplementados com concentrações sub-inibitórias de rifampicina. Por isso, esta estirpe é diferente de outras brucelas atenuadas, uma vez que não possui a cadeia O-LPS, conseqüentemente, os anticorpos contra este antígeno imunodominante não são induzidos por vacinas preparadas com a estirpe RB51, quando utilizado em bezerros ou repetidamente administrado em vacas adultas. Ou seja, a vacinação com a cepa RB51 confere proteção, sem interferir nos métodos sorológicos usuais, mesmo em vacas adultas.

Alguns trabalhos indicam que a RB51 é segura quando inoculada em fêmeas gestantes, porém apenas na dose reduzida. A Vacina com a RB51 foi aprovada para utilização como vacina oficial nos EUA, Chile e Uruguai como um substituto para a B19, ou em conjunto com S19 no México, Paraguai, Venezuela e alguns países da América Central. A vacina RB51 para uso em programas na maior parte dos Países acima mencionados foi licenciada para vacinação subcutânea de fêmeas jovens (4-12 meses de idade), com a dose completa de  $1,0-3,4 \times 10^{10}$  UFC. No entanto, o uso da dosagem indicada para bezerros (dose completa) em vacas adultas ou gestantes não foi tão estudada, apesar de algumas informações de campo sugerirem que doses mais elevadas podem não causar perceptível aumento das taxas de aborto.

As leis federais brasileiras, do MAPA, através do "Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose" - PNCEBT estipula que uma das estratégias para controle da brucelose no país é a vacinação obrigatória de novilhas com 3-8 meses de idade com a B19 a fim de se evitar concentrações de anticorpos persistentes nos testes sorológicos de rotina realizados após os 24 meses de idade. De acordo com o PNCEBT, a vacinação com a cepa RB51 pode ser aprovada como estratégia de imunização apenas sob certas circunstâncias: rebanhos

altamente infectados ou vacas adultas e bezerras que não foram vacinadas até os oito meses de idade.

Como a transmissão da doença ocorre principalmente por contaminação via oral, originada de secreções, anexos fetais ou fetos paridos ou abortados de fêmeas doentes, o aumento da proteção dos animais adultos, principalmente as fêmeas gestantes, é de especial importância em diversas situações onde se deseja um rápido controle na disseminação do agente.

O presente estudo se justifica pela ausência de informações da literatura que permitem afirmar se a vacina RB51 em doses normais é segura para fêmeas bovinas nos diferentes estágios de gestação (BRASIL, 2006).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico e Definição**

A brucelose é uma zoonose conhecida desde épocas remotas. Hipócrates, em 460 A.C., já fazia referência à pacientes com sintomas semelhantes à brucelose. Recentemente, pesquisas realizadas na Itália, revelaram lesões ósseas típicas de brucelose em esqueletos remanescentes de pessoas que sucumbiram à catástrofe do vulcão Vesúvio, na cidade de Herculano, ocorrida no ano 79 da era cristã. Graças à microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de cocobacilos compatíveis com *Brucella* em queijos fabricados com leite de cabras e em lesões típicas em ossos de indivíduos adultos mortos encontrados carbonizados em escavações da cidade italiana (CAPASSO, 2002). Oficialmente, a doença foi registrada entre os anos de 1853 e 1856 em marinheiros e soldados da Marinha Real Britânica (WYATT, 1999).

A brucelose é uma doença infecto-contagiosa provocada por bactérias do gênero *Brucella*. A infecção produzida pela doença é característica nos animais e pode infectar o homem. É uma zoonose distribuída universalmente que acarreta problemas sanitários importantes e prejuízos econômicos vultosos. As principais manifestações nos animais são abortos, nascimentos prematuros, esterelidade e baixa produção de leite as quais contribuem para uma considerável baixa na produção de alimentos. No homem, a sua manifestação clínica é responsável por incapacidade parcial ou total para o trabalho (BRASIL, 2006).

### **2.2 Etiologia**

Análises realizadas com o gene 16S rRNA, por hibridização DNA-DNA e provas bioquímicas sugerem que as espécies de *Brucella* constituem um gênero monofilético, além disso, o alto grau de similaridade entre elas suporta a proposta de que as espécies clássicas de *Brucella* sejam amostras de *B. melitensis*. Verger e colaboradores (1987) propuseram uma única espécie:

*Brucella melitensis*, subdividindo-a em biovars, *B. melitensis* biovar Abortus, *B. melitensis* biovar Suis, *B. melitensis* biovar Canis, *B. melitensis* biovar Neotomae e *B. melitensis* biovar Ovis (PEREIRA, 2011).

Entretanto, esta visão é conflitante com a hipótese clássica evolutiva que denomina as espécies de acordo com os hospedeiros preferenciais. A comum associação entre patógenos-hospedeiros possibilita a divisão do gênero *Brucella* em dez espécies da seguinte forma: *B. melitensis* em caprinos (podendo infectar bovinos, ovinos, canídeos e humanos); *B. abortus* em bovinos (bubalinos, equinos, cervídeos, canídeos e humanos); *B. ovis* em ovinos, *B. suis* em suínos, *B. neotomae* em ratos do deserto, *B. canis* em canídeos (humanos) (CORBEL; BRINLEY-MORGAN, 1984); *B. ceti* (golfinhos e baleias); *B. pinnipedialis* (focas e leões marinhos) (FOSTER et al., 2007); *B. microti* (roedor *Microtus arvalis*) (SCHOLZ et al., 2008) e *B. inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010).

As duas únicas espécies naturalmente rugosas são *B. canis*, causadora da brucelose canina e considerada a menos patogênica para o homem, e *B. ovis*, que só foi encontrada infectando naturalmente ovinos (CORBEL, 1997). As espécies *B. neotomae* e *B. microti*, isoladas de roedores silvestres, não são consideradas zoonóticas (CORBEL, 1997; SCHOLZ et al., 2008). *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, patogênicas para mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2007), já foram associadas a granulomas intracerebrais em pacientes com neurobrucelose (SOHN et al., 2003), osteomielite da coluna vertebral (MCDONALD et al., 2006) e a acidentes laboratoriais (BREW et al., 1999; POESTER et al., 2009). As três espécies principais, também denominadas clássicas, são subdivididas em biovariedades ou biovars: *B. abortus* – 7 biovars; *B. melitensis* – 3 biovars; *B. suis* – 5 biovars (BRASIL, 2006).

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com morfologia de cocobacilos Gram-negativos, imóveis; podem apresentar-se em cultivos primários com morfologia colonial lisa e rugosa (rugosa estrita ou mucóide). Essa morfologia está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, elemento central nos fenômenos imunológicos e para algumas espécies tem relação com a virulência. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* normalmente apresentam uma morfologia de colônia do tipo lisa; quando evoluem para formas rugosas ou mucóides, deixam de ser patogênicas. Já as espécies *B. ovis* e *B. canis* apresentam uma morfologia de colônia permanentemente do tipo rugosa ou mucóide (BRASIL, 2006; OSÓRIO & MONTEIRO, 2006).

Embora os bovinos e bubalinos sejam susceptíveis à *B. suis* e *B. melitensis*, inequivocadamente a espécie mais importante é a *B. abortus*, responsável pela grande maioria das infecções (BRASIL, 2006).

As brucelas não têm genes de virulência clássicos que codificam cápsulas, plasmídeos ou exotoxinas em comparação com outros patógenos bacterianos. Relativamente pouco se sabe

sobre os fatores que contribuem para a persistência no hospedeiro e multiplicação dentro de células fagocíticas. Além disso, muitos aspectos da interação entre a brucela e seu hospedeiro permanecem obscuros (SELEEM, 2010).

## **2.3 Epidemiologia**

### **2.3.1 Situação Mundial**

A doença ocorre em todo o mundo, exceto nos países onde a brucelose bovina (*B. abortus*) foi erradicada. Esta é definida como a ausência de casos notificados durante pelo ao menos cinco anos. Esses países incluem Austrália, Canadá, Chipre, Dinamarca, Finlândia, Holanda, Nova Zelândia, Noruega, Suécia, Reino Unido, Alemanha e Luxemburgo (SELEEM, 2010), países situados ao norte do continente europeu, já receberam a qualificação de livres de brucelose bovina. França, Grécia, Irlanda, Itália, Portugal e Espanha, embora ainda não tenham sido declarados livres de brucelose bovina, encontram-se em fase adiantada de erradicação (GODFROID E KÄSBOHRER, 2002). Índia, Ásia Central, México e América Central e América do Sul ainda não estão isentos da brucelose (SELEEM, 2010).

Na Grã-Bretanha, a brucelose bovina foi erradicada em 1979, e o país foi reconhecido como livre da doença desde 1985. Nesse país, a doença foi reintroduzida em várias ocasiões, especialmente por meio de gado importado, sendo, porém detectada pelo sistema de vigilância, que inclui testes mensais em amostras de leite nos rebanhos leiteiros, testes sorológicos periódicos em gado de corte, controle rigoroso da parição em animais importados e investigação minuciosa de abortos (MCGIVEN et al., 2008).

Os Estados Unidos da América iniciaram o combate à brucelose em 1934, como parte do programa de redução da população bovina, necessária em razão da grande depressão econômica pela qual o país atravessava na época. Até então, a prevalência da enfermidade entre os bovinos era de 11,5%. O programa de controle foi organizado e posto em prática pelo governo federal, pelos governos estaduais e pelos produtores de carne e leite. Como resultado, em dezembro de 2000 não havia mais registros de rebanhos afetados por brucelose no país (RAGAN, 2002).

Nos países em desenvolvimento, a situação não é tão favorável. O México, endêmico para a brucelose, começou a combatê-la em 1942, mas, apesar de alguns avanços obtidos ao longo dos anos, a situação ainda está longe de ser a ideal. Além do mais, nesse país existe a presença da *B. melitensis*, mais patogênica para o homem (LUNA-MARTINEZ E MEJÍA-TERAN, 2002). Na América Central, a prevalência da brucelose bovina tem sido estimada entre 4 e 8% e programas baseados em vacinação e remoção de reagentes pouco têm contribuído para o avanço no controle da enfermidade (MORENO, 2002). No Paraguai, testes sorológicos realizados em 1,2 milhões de amostras, no período de 20 anos (1979-2000), indicaram que a quantidade de animais

reagentes permaneceu constante entre 3 e 4% (BAUMGARTEN, 2002). Na Argentina, diversos estudos têm demonstrado que a brucelose está presente na maioria das espécies domésticas. Estima-se que a prevalência da brucelose bovina em propriedades seja de 10 a 13% e que 4 a 5% dos animais estejam infectados, o que resulta em perda anual calculada ao redor de 60 milhões de dólares (SAMARTINO, 2002).

Existem somente 17 países livres da doença, e enormes investimentos em vigilância são necessários para manter o status. Outros sofrem com perdas de produtividade e com dificuldades comerciais, e também com o resultado da condição debilitante no homem. Há uma estimativa que ocorra 500.000 infecções humanas por ano no mundo (CUTLER; WHATMORE; COMMANDER, 2005).

### **2.3.2 Situação Brasileira**

No Brasil, são poucos os estudos bem planejados e de grande abrangência sobre a situação da brucelose bovina. O último estudo nacional, que envolveu 19 estados, foi realizado em 1975. Foram verificadas as seguintes prevalências em animais, por regiões: Sul, 4%; Sudeste, 7,5%; Centro-Oeste, 6,8%; Nordeste, 2,5% e Norte, 4,1% (BRASIL, 2006). Depois disso, apenas cinco estados realizaram trabalhos que envolveram todo o seu território (POESTER et al., 2002; PAULIN E FERREIRA NETO, 2003), com uso de diferentes metodologias. Portanto, a situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil não é adequadamente conhecida (POESTER et al, 2009).

Estudos mostram que a brucelose parece estar disseminada por todo o território brasileiro, com maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Os dados oficiais, publicados no Boletim de Defesa Sanitária Animal, mostram que a prevalência de animais positivos no Brasil manteve-se entre 4% e 5% no período entre 1988 e 1998 (BRASIL, 2006).

Um levantamento realizado em 1999, no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, envolvendo aproximadamente 1.600 propriedades e 23.000 animais, estimou a prevalência aparente de animais infectados em 0,8%. No mesmo estudo, foram detectadas 5% de propriedades com animais reagentes, sendo importante destacar que esse valor subiu para 15% no universo de propriedades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção (BRASIL, 2006).

O Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP) e as coordenadorias regionais de alguns Estados do Brasil fizeram uma parceria a fim de realizar um levantamento epidemiológico da caracterização espacial da brucelose bovina no território nacional (DIAS, 2004). Os Estados participantes possuem 81,6 % do efetivo bovino. Os estudos já foram concluídos nos Estados: RS,

SC, PR, SP, RJ, ES, MG, BA, SE, TO, GO, DF, MS, MT e RO. Dos levantamentos foi possível verificar a heterogeneidade das unidades federativas avaliadas e também dentro das mesmas. O Estado de SC, o norte do RS, sul do PR, DF e BA são áreas de baixíssima prevalência, podendo evoluir em breve para a erradicação da doença (FERREIRA NETO, 2010). Abaixo segue o mapa com os resultados obtidos.

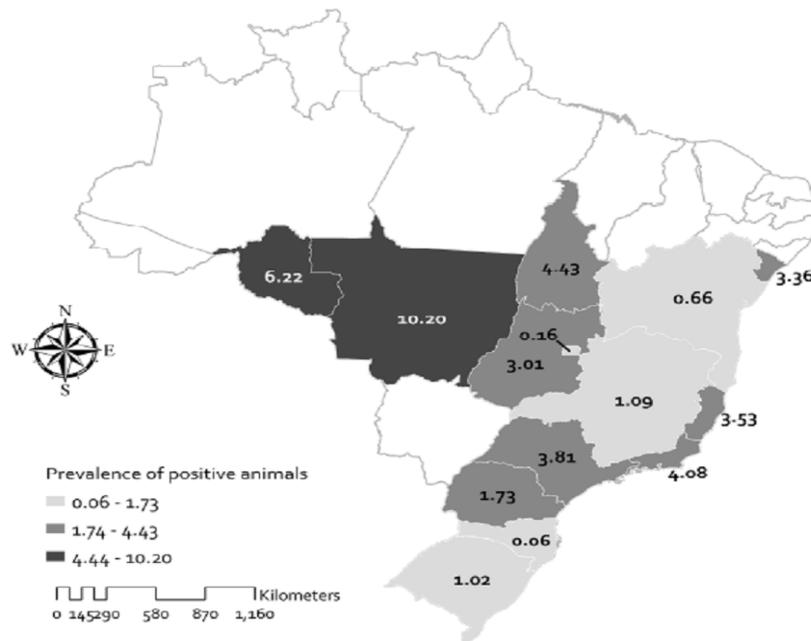


Figura 1: Prevalência de animais positivos nos diferentes Estados da Confederação. Fonte: Ferreira Neto (2010).

Minervino *et al* (2011) realizaram um estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no Estado do Pará. Num total de 7.724 resultados de exames, de 14 municípios, foram observados 792 bovinos positivos, prevalência média de 10,25%, sendo maior em vacas e novilhas quando comparadas aos touros. Estes resultados indicam que a Brucelose está disseminada em todo o Estado do Pará.

No Estado do Mato Grosso, foram amostrados 13.684 animais, provenientes de 1.152 rebanhos. As amostras foram testadas com AAT e os animais positivos reexaminados com mercapto-etanol. A prevalência foi de 41,2% e 10,2% respectivamente. Concluiu-se que a doença está distribuída homoganeamente no Estado (NEGREIROS, 2009).

O Estado de Santa Catarina foi estratificado em cinco circuitos produtores, sendo amostrados 300 propriedades em cada circuito, num total de 7.801 animais provenientes de 1.586 estabelecimentos. Foi considerado positivo a amostra que foi reagente às duas provas sorológicas. A prevalência de animais infectados no Estado foram de 0,06% (SIKUSAWA, 2009).

Em relação a situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins, num total de 20.908 soros obtidos de 1.842 propriedades, detectou-se a prevalência das propriedades de 21,2% (OGATA, 2009).

## **2.4 Perdas Econômicas**

O Brasil apresenta grande potencialidade para o desenvolvimento da exploração pecuária, no entanto, os valores médios de produção e produtividade dos rebanhos nacionais situam-se entre os mais baixos do mundo. Esta ineficiência na produção de carne e leite é altamente influenciada pela baixa fertilidade dos rebanhos (VASCONCELOS; ITO; CORTES, 1987).

A brucelose ocasiona uma série de alterações fisiológicas que comprometem a produção animal. Estimativas mostram ser a brucelose responsável pela diminuição de 25% na produção de leite e de carne e pela redução de 15% na produção de bezerros. Dentro das perdas indiretas, deve-se salientar as que resultam em infecções humanas, relacionadas estas, com os custos do diagnóstico e tratamentos além da decorrente ausência no trabalho (BRASIL, 2006).

Lucas (2006) calculou o impacto econômico da brucelose bovina a partir de um banco de dados socioeconômico (CEPEA, ESALQ, USP) onde foram reunidas informações de propriedades leiteiras divididas em MG/GO (região I), computando prejuízos anuais atribuídos a doença em cerca de 13% e em SC/RS (região II), os mesmos foram de aproximadamente 5%. Os prejuízos totais atribuídos ao impacto causado pela brucelose bovina nas propriedades leiteiras amostradas foram de R\$ 18.532,80 e de R\$ 4.279,94 respectivamente para as regiões I e II, quando expressos em reais ou de 39.131,60 e 10.204,83 se referidos em litros perdidos por ano.

As perdas econômicas atribuídas à brucelose bovina assumem grande importância em rebanhos de corte no qual o bezerros representam a única fonte de renda (RADOSTITS, 2000). Nos Estados Unidos, estimou-se, em 1983, que os prejuízos causados pela brucelose bovina foram da ordem de 32 milhões de dólares, apesar do programa americano ter se iniciado há mais de 40 anos (BRASIL, 2006).

Estudos realizados em 2013 demonstraram que o prejuízo total da brucelose no Brasil foi estimado em U\$ 448 milhões que equivale, hoje, a cerca de R\$ 1,005 bilhão. A cada 1% de variação na prevalência, estima-se o incremento no prejuízo de U\$ 77,85 milhões ou R\$ 174,70 milhões no custo da brucelose bovina no Brasil. As perdas por fêmea infectada, com idade superior a 24 meses, foram estimadas em R\$ 473,50 e R\$ 255,20 em rebanhos de leite e de corte, respectivamente (ROSINHA, 2014).

## **2.5 Resistência**

As bactérias do gênero *Brucella*, apesar de permanecerem no meio ambiente, não se multiplicam nele. Elas são medianamente sensíveis a fatores ambientais e a resistência diminui quando aumentam a temperatura e a luz solar direta ou diminui a umidade, portanto, é recomendado que se procure deixar os locais com altas taxas de contaminação expostos ao sol, que é um potente germicida. A sobrevivência é alta, chegando próximo aos 200 dias no exsudato uterino eliminado pelos animais positivos nos abortos e partos (BRASIL, 2006).

Submetida à ação de desinfetantes como produtos clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeídos a 2%, em temperatura ambiente acima de 15° C ou compostos fenólicos a 2,5%, a brucela é eliminada no prazo de 15 minutos (PAULIN, 2003). E ainda de acordo com Radostits (2000), o congelamento permite uma sobrevivência quase indefinida.

## 2.6 Mecanismos de Transmissão

No animal infectado, as localizações de maior frequência do agente são: linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, útero e úbere (BRASIL, 2006). Uma enorme quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o abortamento e parto de animais infectados e estes, continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias, contaminando pastagens, água, alimento e fômites (CRAWFORD *et al*, 1990; BRASIL, 2006).

A porta de entrada mais importante é o trato digestivo através da ingestão de água e alimentos contaminados ou pelo hábito de lambar as crias recém-nascidas, mesmo por cheirar fetos abortados, pois a bactéria pode entrar pelas mucosas nasais e oculares (ACHA; SZYFRES 2001; BRASIL, 2006).

As fêmeas em lactação e infectadas podem se tornar portadoras assintomáticas e disseminar a doença através do leite. Os bezerros que ingerem o leite das vacas infectadas podem albergar as brucelas nos linfonodos do trato gastrointestinal e excretá-las nas fezes, uma vez que nem todas as brucelas são destruídas no trato gastrointestinal. Entre seis a oito semanas após o desmame, os bezerros tornam-se livres da infecção, pois até seis meses de idade são pouco susceptíveis à mesma, contudo, a partir da maturidade sexual, tornam-se altamente susceptíveis (LUCAS, 2006). A transmissão congênita também pode ocorrer (ACHA; SZYFRES, 2001).

Filhos de vacas brucélicas se infectam durante a gestação, com a brucela persistindo em seus pulmões e linfonodos regionais. As novilhas serão sorologicamente negativas ou possuirão títulos sorológicos instáveis, soro convertendo-se a partir da metade de sua primeira gestação, podendo, inclusive, eliminar o agente etiológico. Nesse caso, a vacinação é ineficaz. Acredita-se que tal fenômeno, chamado de portador latente, ocorra numa frequência de 2,5 a 9% em condições naturais de campo (PAULIN, 2003).

A participação do touro na transmissão da brucelose na monta natural é pequena, pois a vagina apresenta barreiras inespecíficas que dificultam a infecção (CAMPERO, 1993). Já na

inseminação artificial, o sêmen contaminado é altamente infeccioso, isto porque o sêmen é depositado diretamente no útero onde estas barreiras inespecíficas não existem. Deste modo, uma fêmea é infectada com pequenas quantidades do agente o que se torna uma forma eficiente de difusão da doença nos plantéis (CRAWFORD et al, 1990; CAMPERO, 1993; BRASIL, 2006).

A técnica de transferência de embriões não apresenta risco de transmissão da doença desde que realizada segundo os protocolos internacionais preconizados de lavagem e pode ser utilizada para aproveitamento de vacas infectadas geneticamente superiores com sucesso (LAGE et al, 2009; BRASIL, 2006).

A *B. abortus* também pode infectar outras espécies domésticas, tais com equídeos, suínos, ovinos, caprinos, bubalinos e cães. Geralmente, não é transmitida aos suínos, e quando isso ocorre, a infecção é transitória, podendo servir de fonte de infecção para bovinos (PAULIN, 2003).

Os cães não são susceptíveis a *B. abortus*, mas são importantes disseminadores da bactéria por transportarem restos de abortos entre pastos e propriedades (VASCONCELOS, ITO, CORTES, 1987). Equinos, que convivem com animais infectados, podem adquirir brucelose e a manifestação clínica mais comum é a presença de abscessos (fistulados ou não) na região da cernelha, lesão conhecida como “mal da cernelha” ou “mal das cruces”. Animais nestas condições devem ser eliminados (POESTER, 2009).

Antes da adoção da pasteurização do leite, a principal via de transmissão da brucelose para o homem era dada pelo consumo de leite *in natura* e derivados, provenientes de animais doentes (DIAS, 2004).

## **2.7 Patogenia**

A infecção da *B. abortus* se dá pelo contato do agente por qualquer mucosa do animal susceptível, geralmente oral ou nasal. Após a penetração na mucosa, há um curto período de bacteremia e posteriormente são fagocitadas pelos leucócitos polimorfonucleares (PMN) se alojando em diversos órgãos, linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero, preferencialmente no sistema linfático e placenta fetal. Eventualmente, pode instalar-se nas articulações mais exigidas, dando origem a lesões denominadas higromas, que podem supurar (THOEN et al, 1993; RADOSTITS, 2000; BRASIL, 2006).

As brucelas podem sobreviver dentro dos leucócitos do hospedeiro e utilizar tanto os neutrófilos quanto os macrófagos para se proteger dos mecanismos bactericidas humorais e celulares durante o período de disseminação hematológica (ENRIGHT, 1990). O período de incubação pode ser de poucas semanas e até mesmo de meses e anos. Este período é inversamente proporcional ao tempo de gestação, ou seja, quanto mais adiantada a gestação, menor será o período de incubação (BRASIL, 2006).

Um grande número de microorganismos pode ser encontrado nos trofoblastos coriônicos que contenham células metabolicamente ativas capazes de produzir uma variedade de hormônios e proteínas secretoras que possam estimular o crescimento das bactérias. Nos bovídeos, destacam-se produtos de degradação dos hormônios esteróides, a prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2 α</sub>) e o estradiol-17β (E17β), além de outras progestinas (QUINN et al., 1994). No terço final da gestação a produção de eritról, um poli álcool composto por quatro carbonos, aumenta, propiciando a replicação intracelular massiva e culmina com o rompimento do trofoblasto infectado, permitindo que a bactéria acesse diretamente o feto (PACHECO, 2007).

O metabolismo do eritról é uma característica marcante do gênero *Brucella*. Experimentos demonstraram que o eritról é capaz de estimular o crescimento de todas as espécies de *Brucella* em meios de cultura. Altas concentrações de eritról na placenta e no útero gravídico, juntamente com a estimulação do crescimento, deram origem ao paradigma de que este açúcar é responsável pelo tropismo da bactéria para os tecidos (SMITH; FICHT, 1990).

A multiplicação da bactéria leva à necrose e/ou deposição de fibrina nos placentomas, infectando também as células adjacentes, levando a uma reação inflamatória da placenta, comprometendo a viabilidade do feto e ocasionando o aborto (RADOSTITS, 2000; BRASIL, 2006; PACHECO, 2007). Por outro lado, quanto menos intensa a necrose maior será a deposição de fibrina e mais tardio o abortamento (PAULIN, 2003).

As lesões placentárias raramente atingem todos os placentomas; em geral, apenas parte deles é afetada. Com o desenvolvimento da imunidade celular após o primeiro aborto, há uma diminuição do número e do tamanho das lesões dos placentomas nas gestações subseqüentes. Com isso, o aborto torna-se infreqüente (CORBEL et al., 2006), aparecendo outras manifestações da doença, como, por exemplo, a retenção de placenta, a natimortalidade ou o nascimento de bezerros fracos (THOEN ET AL., 1993; BRASIL, 2006).

O curso da doença vai depender do estado fisiológico do animal. Animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção, infectando principalmente linfonodos e glândula mamária. Quando em fêmeas bovinas gestantes, apresentam predileção pelo útero (CRAWFORD et al., 1990).

## **2.8 Sinais Clínicos e Lesões**

A brucelose pode manifestar-se de maneira distinta conforme o hospedeiro. Nos bovinos e bubalinos, a principal manifestação clínica é o aborto, que ocorre em torno do sétimo mês de gestação. Após a infecção, o aborto quase sempre acontece na primeira gestação, mas, em decorrência do desenvolvimento da imunidade celular, é pouco freqüente na segunda gestação após a infecção, e muito raro nas subseqüentes. Observa-se então natimortos e o nascimento de bezerros fracos (BRASIL, 2006; LAGE ET AL., 2008).

O feto geralmente é abortado 24 a 72 horas depois de sua morte, sendo comum sua autólise. Não há nenhuma lesão patognomônica da brucelose no feto abortado, mas, com freqüência, observa-se broncopneumonia supurativa (PAULIN, 2003; BRASIL, 2006).

Também são características da doença a repetição de cio e perdas na produção de leite por mastites inespecíficas, além de metrites que podem ser causa de infertilidade transitória ou permanente (ACHA; SZYFRES, 2001). Causa ainda nas fêmeas uma placentite necrótica, sendo comum a retenção de placenta e corrimentos vaginais (PACHECO, 2007).

Nos machos existe uma fase inflamatória aguda, seguida de cronificação, frequentemente assintomática. As bactérias podem instalar-se nos testículos, epidídimos e vesículas seminais. Um dos possíveis sinais é a orquite uni ou bilateral, transitória ou permanente, com conseqüente infertilidade por diminuição da qualidade espermática, com aumento ou diminuição do volume dos testículos. Em outros casos, o testículo pode apresentar um aspecto amolecido e cheio de pus. Lesões articulares também podem ser observadas (CAMPERO, 1993; ACHA; SZYFRES, 2001; BRASIL, 2006).

No aparelho locomotor, podem ser observadas lesões articulares que se caracterizam por bursite, artrite, espondilites em vértebras torácicas e lombares, podendo atingir medula óssea e tendões (PAULIN, 2003, BRASIL, 2006, LAGE, 2008).

## **2.9 Resposta Imune na Infecção e Vacinação**

As bactérias do gênero *Brucella* são parasitas intracelulares facultativos, com capacidade de se multiplicar e sobreviver dentro de macrófagos. Em razão dessa habilidade, a proteção contra a infecção e a eliminação da bactéria do organismo hospedeiro dependem primariamente da resposta imune mediada por células (BRASIL, 2006).

A resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *B. abortus* envolve tanto a resposta inata como a adquirida. A imunidade adquirida é mediada por linfócitos B e T que reconhecem os patógenos por meio de receptores de alta afinidade. No entanto, o estabelecimento da imunidade adquirida é lento porque depende da ativação de genes, da síntese de proteínas e da proliferação celular. Já a imunidade inata proporciona mecanismos de defesa mais rápidos, pois reconhecem patógenos invasores por meio de receptores específicos localizados na superfície das células apresentadoras de antígeno. A ligação dos receptores a este patógeno induz a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio, citocinas pró-inflamatórias com regulação de moléculas co-estimuladoras que desencadeiam a imunidade adquirida (WERLING; JUNGI, 2003).

Apesar dos macrófagos serem uma barreira de defesa contra *Brucella* por serem considerados as células mais importantes do sistema imune, encontrados na interface entre a imunidade inata e adquirida e, destruindo bactérias fagocitadas (ROSENBERGER; FINLAY, 2003), a *Brucella* possui a habilidade de sobreviver e replicar dentro do macrófago e outras células

do hospedeiro tornando-se inacessível a mecanismos extracelulares de controle do hospedeiro, como os anticorpos e complemento (CHEERS; HO, 1983).

Além da resposta imune celular, anticorpos específicos (imunidade humoral) contra a cadeia “O” também são produzidos durante a infecção. Os anticorpos dirigidos contra o lipopolissacarídeo (LPS) de *Brucella* sp têm sido bastante estudados, de modo especial por serem detectados com facilidade em provas sorológicas. A maioria das imunoglobulinas presentes no soro de bovinos e bubalinos é da classe G (IgG1 e IgG2), seguidas das classes M (IgM) e A (IgA) (BRASIL, 2006). Quando a vacinação é realizada com a vacina B19 em fêmeas entre três e oito meses de idade, as imunoglobulinas da classe IgM aparecem no soro em torno do 5º dia e as imunoglobulinas da classe IgG aparecem quase simultaneamente ou poucos dias depois. O valor máximo de IgM é alcançado em torno do 14ª dia e depois desaparecem. As IgG atingem o valor máximo entre 28-42 dias e depois desaparecem (NIELSEN et al., 1996).

As respostas de IgG2 e IgA aparecem mais tarde, aumentam gradativamente, mas permanecem em níveis baixos (Figura 2). A observação por períodos prolongados da resposta humoral em animais infectados demonstra que há um leve decréscimo dos níveis de IgM, enquanto que os de IgG1 se mantem altos, inalterados. A IgG2 e IgA permanecem em níveis mais baixos e estáveis (Figura 3). A observação por período prolongado em animais vacinados com B19, quando vacinados até 8 meses, demonstra que o nível de anticorpos decresce rapidamente, atingindo títulos inferiores a 25 UI depois de 12 meses (Figura 3). Por outro lado, se a vacinação for realizada acima de 8 meses de idade, os títulos vacinais tendem a permanecer elevados por mais tempo, podendo gerar reações falso-positivas nos testes indiretos de diagnóstico (BRASIL, 2006).

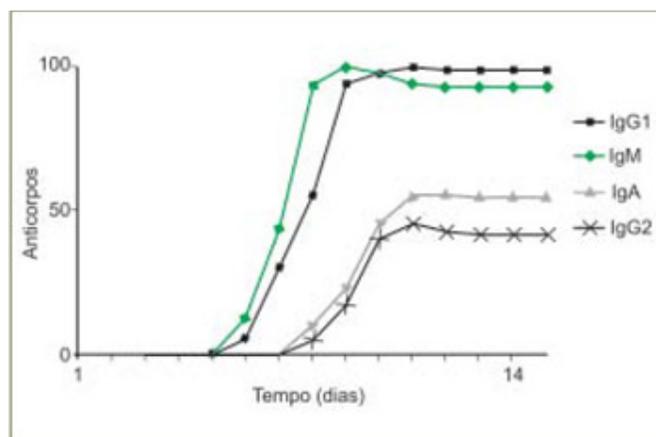


Figura 2 – Resposta dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de *Brucella abortus* ou vacinados com B19 - Fonte: BRASIL (2006)

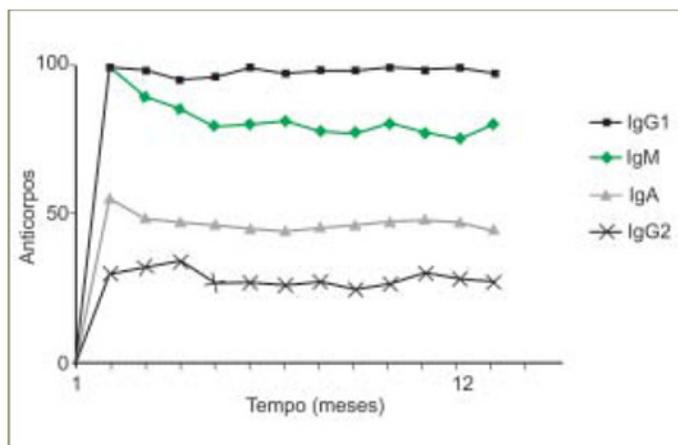


Figura 3 – Resposta a longo termo dos principais isotipos de anticorpos em bovinos infectados com amostra patogênica de *Brucella abortus*- Fonte: BRASIL (2006)

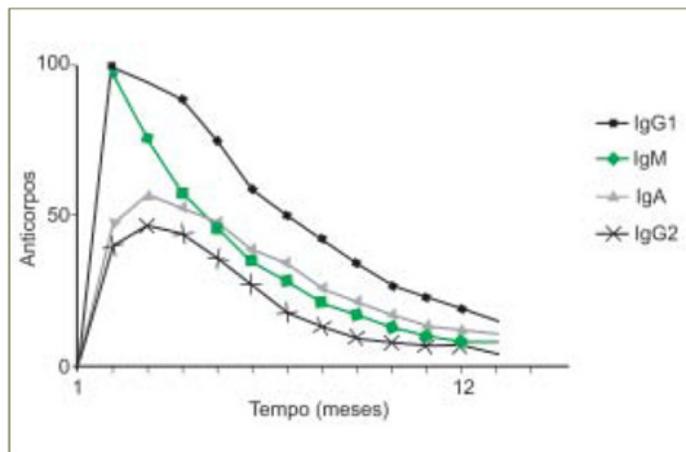


Figura 4 – Resposta a longo termo dos principais isotipos de anticorpos em bovinos vacinados com a amostra B19 de *Brucella abortus* - Fonte: BRASIL (2006)

## 2.10 Diagnóstico

Todo aborto deve ser considerado como suspeito de brucelose e por isso deve ser investigado (POESTER, 2009). O diagnóstico da brucelose pode ser feito pela identificação do agente por métodos diretos, ou pela detecção de anticorpos contra *B. abortus* por métodos indiretos (BRASIL, 2006).

### 2.10.1 Métodos diretos

A maioria dos materiais coletados a campo está potencialmente contaminada com microorganismos secundários. Deste modo, é importante que se empreguem meios de cultura

seletivos, contendo diversos antibióticos que inibam esta microbiota secundária sem afetar o crescimento de *Brucella* sp. (LAGE, 2008).

Os métodos diretos incluem o isolamento e a identificação do agente, imunohistoquímica, e métodos de detecção de ácidos nucleicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR). Entretanto, devido ao risco de contaminação humana durante o processamento da amostra, poucos são os laboratórios que realizam o exame (BRASIL, 2006).

O isolamento e a identificação da *B. abortus* é realizado a partir de material de aborto (feto abortado, membranas fetais, conteúdo estomacal de feto, placenta), leite, swabs vaginais e sêmen (BRASIL, 2006; POESTER et al., 2006). O material pode ser enviado congelado (-20° C) ao laboratório desde que mantenha a temperatura de transporte (LAGE, 2008).

### **2.10.2 Métodos indiretos ou sorológicos**

O diagnóstico é parte essencial de um programa sanitário. A brucelose é diagnosticada por diferentes métodos que se complementam: o diagnóstico clínico baseia-se nos sinais; o epidemiológico, no histórico do rebanho da propriedade e das propriedades vizinhas; e o laboratorial, em exames complementares diretos e indiretos (PAULIN & FERREIRA, 2003).

O sorodiagnóstico é a base do combate à brucelose em rebanhos (PAULIN, 2003). Nos bovinos o diagnóstico se baseia todo em sorologia. Atualmente se dispõe de um grande número de provas sorológicas que podem ser úteis se empregadas com critério (ACHA, 2001). O conhecimento da dinâmica das imunoglobulinas nos diferentes estágios da resposta imune tem orientado o desenvolvimento de inúmeros testes sorológicos. Esses testes visam demonstrar a presença de anticorpos contra *Brucella* sp em vários fluidos corporais, como soro sanguíneo, leite, muco vaginal e sêmen (POESTER et al., 2005).

As provas de soroprecipitação foram e são muito usadas e contribuíram grandemente para reduzir as taxas de infecção na Europa, Austrália e nas Américas. Não obstante, quando a proporção de rebanhos infectados e a prevalência global chegam a uma taxa reduzida, recorre-se a outras provas para poder erradicar a infecção (ACHA, 2001).

Um teste sorológico perfeito deveria detectar infecção nos estágios iniciais da doença, antes da ocorrência do aborto, e deveria discriminar anticorpos de vacinação e de infecção; da mesma maneira, não deveria apresentar reações falso-positivas ou falso-negativas (BRASIL, 2006).

As reações falso-positivas são decorrentes de dois fatores distintos. Primeiro, a reação pode ocorrer devido à presença de anticorpos não específicos presentes nas infecções por outras bactérias, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* sp, *Escherichia coli* O:157, ou *Pseudomonas* sp. Segundo, podem decorrer como resultado da vacinação com B19 após a idade recomendada (BRASIL, 2006).

A resposta sorológica à infecção por *Brucella* sp é influenciada por muitos fatores, os quais refletem no desempenho das diferentes provas sorológicas. Destacam-se, entre esses fatores, o longo e variável período de incubação da doença, durante o qual a sorologia pode ser negativa, a condição vacinal dos animais, a natureza do desafio, a variação individual de resposta à vacinação e à infecção e o estágio da gestação no momento da infecção. A melhor estratégia – que tem sido validada por vários países que conseguiram avanços significativos no combate à brucelose – costuma ser a combinação de testes, utilizados em série. É utilizado como base a escolha de um teste de triagem de fácil execução, barato e de boa sensibilidade, seguido de um teste confirmatório, a ser realizado apenas nos soros que resultarem positivos no teste anterior, geralmente mais elaborado, porém com melhor especificidade que o de triagem. Esse teste confirmatório tem que ter também boa sensibilidade (BRASIL, 2006).

O sucesso de um programa de controle da brucelose depende muito da escolha dos testes que serão utilizados para o diagnóstico. Os critérios adotados para a escolha são: custo, praticidade, repetibilidade, sensibilidade e especificidade, além da situação epidemiológica da doença (CHAPPEL, 1989).

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 triagem; os dois últimos como confirmatórios. Células inteiras da amostra de *B. abortus* 1119-3 são utilizadas na preparação dos antígenos (BRASIL, 2006).

### **2.10.3 Testes de Triagem**

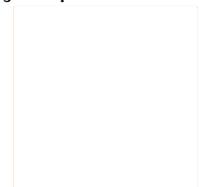
Teste de soroaglutinação com Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

A prova do AAT consiste em uma soroaglutinação em placa, em que o antígeno, na concentração de 8% de volume celular, é tamponado em pH baixo (3,65) e corado com rosa de Bengala. Essa acidificação do antígeno reduz a atividade da IgM, tornando a prova seletiva para a identificação de IgG1 (ALTON et al., 1988).

A maioria dos soros de animais bacteriologicamente positivos apresenta reação a essa prova. Como podem ocorrer alguns poucos casos de reações falso-positivas em decorrência da utilização da vacina B19, sugere-se a confirmação por meio de testes de maior especificidade para se evitar o sacrifício de animais não infectados. É uma prova qualitativa, pois não indica o título de anticorpos do soro testado (BRASIL, 2006).

### **2.10.4 Teste do anel em Leite (TAL)**

Foi idealizado para ser aplicado em misturas de leite de vários animais, uma vez que a baixa concentração celular do antígeno (4%) torna-o bastante sensível. Comumente são utilizados antígenos corados com hematoxilina, que dá a cor azul característica à reação positiva. Se



existirem anticorpos no leite, formará um anel azulado na camada de creme do leite (reação positiva). É uma prova de grande valor não só para se detectar rebanhos infectados, como também para se monitorar rebanhos leiteiros livres de brucelose (BRASIL, 2006).

### **2.10.5 Testes Confirmatórios**

#### **2.10.6 Teste do 2-mercaptoetanol (2-ME)**

É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é a imunoglobulina indicativa de infecção crônica. Deve ser executada sempre em paralelo com a prova lenta em tubos (BRASIL, 2006). O 2-ME inativa a atividade aglutinante da IgM mediante processo químico, degradando-a em cinco sub unidades não aglutinantes (PAULIN et al, 2002). Resultados positivos em ambas as provas indicam a presença de IgG, que são as aglutininas relacionadas com infecção, devendo os animais ser considerados infectados (BRASIL, 2006).

#### **2.10.7 Teste de soroaglutinação**

Também chamada de prova lenta (porque a leitura dos resultados é feita em 48 horas), é a prova sorológica mais antiga e ainda hoje bastante empregada. Em anos recentes, com o melhor conhecimento das diferentes classes de Ig, surgiram dúvidas com relação a sua eficácia. No PNCEBT ela é utilizada em associação com o teste do 2-Mercaptoetanol para confirmar resultados positivos em provas de rotina (MEGID, 2000; BRASIL, 2006).

#### **2.10.8 Fixação de complemento (FC)**

A reação de fixação de complemento apresenta, entre os testes clássicos, a maior sensibilidade analítica para detectar IgG1, além de que a IgG1 é o único isotipo detectável nas condições em que o teste é realizado (WRIGHT & NIELSEN, 1990).

Este teste tem sido empregado em diversos países que conseguiram erradicar a brucelose ou estão em fase de erradicá-la. É o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais. Na brucelose bovina, apesar de a FC detectar tanto IgG1 como IgM, o isotipo IgG1 é muito mais efetivo como fixador do complemento (BRASIL, 2006).

#### **2.10.9 Teste de polarização fluorescente (FPA)**

De acordo com a Instrução Normativa No-27, de 20 de outubro de 2010, o teste FPA poderá ser utilizado como teste único ou como teste confirmatório de diagnóstico para a brucelose (GITTI, 2010).

O FPA é um dos métodos do PNCEBT criado pelo MAPA para combater a brucelose, com o exame é possível calcular em poucos minutos a quantidade de anticorpos presente no soro ou no leite testado.(MATHIAS et al, 2010). Pode ser realizado em soro e leite e tem-se mostrado muito promissor para o diagnóstico de brucelose também em outras espécies (BRASIL, 2006).

O teste é baseado na diferença de rotação entre a molécula do antígeno solúvel, marcado com fluorocromo e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. Um complexo maior gira com menor velocidade e um complexo menor gira mais rapidamente gerando uma rápida despolarização da luz (NIELSEN e GALL, 2001).

#### **2.10.10 Teste de Elisa indireto (I-Elisa) e Teste de Elisa competitivo (C-Elisa)**

Existem vários protocolos de I-Elisa que têm apresentado bons resultados. O teste possui alta sensibilidade; entretanto, sua especificidade assemelha-se àquela do AAT. Já o teste competitivo é um teste muito sensível e específico, e é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como teste confirmatório para o diagnóstico de brucelose, assim como a FC seu custo é elevado (BRASIL, 2006).

### **2.11 CONTROLE**

A central de resoluções adotadas pelo Comitê Internacional e as recomendações emitidas pelas Comissões Regionais, recomendaram à Sede da OIE que elaborasse uma única lista de enfermidades de declaração obrigatória para animais terrestres e aquáticos para substituir as antigas listas A e B. Antes desta aprovação a Brucelose pertencia a Lista B da OIE, hoje se enquadra na lista enfermidades, infecções e infestações comuns à várias espécies. Esta lista foi criada em 2006, é revisada periodicamente e em caso de emendas adaptadas pela Assembléia Mundial durante sua sessão geral anual, a lista nova entra em vigor a partir de 1º de janeiro do ano seguinte (OIE, 2014).

É um pouco paradoxal que a brucelose possa ser considerada uma zoonose reemergente que afeta muitos animais e pessoas em todo o mundo. O paradoxo reside no fato de que são conhecidas as medidas eficazes de controle e de custo pela comunidade científica e autoridades para implementar as medidas em muitos países. O controle da brucelose animal em países em desenvolvimento exige um esforço considerável capaz de

construir infra-estrutura que educa as pessoas sobre os riscos da doença; forneça equipamentos de laboratório adequados e pessoal treinado para coletar amostras e realizar os testes além da manutenção de registros e vigilância ativa dos programas (SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010).

Os programas bem estruturados e administrados atingem bons índices de controle, com redução significativa da prevalência, depois de aproximadamente 20 anos de trabalho. São programas laboriosos, que demandam ações bem coordenadas dos serviços oficiais e privados, e que trazem, como resultado, não só a eliminação da brucelose bovina, mas também a organização, fortalecimento e amadurecimento dos serviços de saúde animal, bem como a modernização da cadeia produtiva de carne e leite (POESTER et al, 2009).

No programa instituído no Canadá, estimou-se um ganho de 5 dólares para cada dólar investido no programa de controle, em 10 anos (GARCÍA-CARRILLO, 1987). Já o programa de erradicação da brucelose bovina na Austrália produziu um benefício de 55 milhões de dólares australianos para a indústria de laticínios e 488 milhões de dólares australianos para a indústria de carne, com um gasto de 170 milhões de dólares australianos em oito anos (ROE; MORRIS, 1976).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ao verificar a ineficácia das medidas até então adotadas, elaborou e lançou, no início de 2001, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Trata-se de um programa harmonizado com as condutas preconizadas pelos organismos internacionais e suficientemente flexível a ponto de permitir a sua implementação nos heterogêneos estados brasileiros (BRASIL, 2006).

Quando se pretende iniciar um programa de controle de brucelose bovina, é de extrema importância conhecer a situação epidemiológica da doença, por duas razões principais: (1) permitir a escolha das melhores estratégias tendo em vista a frequência e distribuição da doença nas populações estudadas; (2) permitir que seja feito o acompanhamento do programa com vistas a possíveis correções, para evitar desperdício de tempo e de recursos (POESTER et al, 2009)

A menos que haja um forte apoio político para a devida indenização do produtor para as perdas devido ao sacrifício dos animais infectados, é quase impossível controlar esta importante zoonose. Produtores de leite, indústrias e laticínios, empresas de melhoramento, consumidores e autoridades correlacionadas devem trabalhar juntos a fim de encontrar soluções que se adéquem a resoluções práticas para cada país (SELEEM, 2010).

Dias em 2004, propôs um modelo matemático mostrando que deve ser intensificado o esforço para vacinação de fêmeas e que, mesmo assim, os benefícios advindos da adoção desta medida, em termos de queda da prevalência da doença e diminuição do número de abortos, só se darão em prazos que podem alcançar décadas.

### 2.11.1 Vacinas

Desde a identificação do agente etiológico da brucelose, vários pesquisadores têm procurado desenvolver vacinas que sejam protetoras e que não interfiram no diagnóstico da doença. Em decorrência desses estudos, vem sendo desenvolvido um grande número de vacinas vivas atenuadas, mortas, de subunidades, recombinantes e de DNA. Muitas dessas vacinas mostraram-se pouco protetoras, como as vacinas mortas, ou ainda estão em fases de testes, como as vacinas de subunidades, recombinantes e de DNA. As vacinas vivas atenuadas são aquelas que efetivamente foram e ainda são utilizadas nos programas de controle da brucelose. Duas delas, recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), são as mais empregadas: a B19 e a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51). Ambas são boas indutoras de imunidade celular (BRASIL, 2006).

#### 2.11.1.1 Vacina B19

No Brasil, o controle da brucelose era regulamentado pela Portaria 23 de 1976, porém sem atingir a eficácia desejada, pela ausência de um programa estruturado. Apesar da desarticulação nacional, alguns Estados, como o Rio Grande do Sul e Minas Gerais iniciaram programas massais de vacinação do rebanho bovino, em 1965 e 1994, respectivamente (LAGE, 2008).

A vacina B19 é uma amostra de *B. abortus* lisa, que foi isolada do leite de uma vaca Jersey em 1923, pelo Dr. John Buck (WHO, 1997). Depois de acidentalmente esquecida por mais de um ano à temperatura ambiente, a amostra perdeu a virulência e desde a década de 1930 tem sido utilizada como vacina. Por ser a 19<sup>a</sup> cultura de um lote usado na pesquisa, a vacina recebeu esta denominação. Essa vacina foi empregada em vários países que erradicaram a doença como, por exemplo, Austrália, Canadá, Dinamarca, Inglaterra, Holanda, Suécia, entre outros. Foi também a vacina utilizada no programa de controle nos EUA até a primeira metade da década de 1990. No Brasil, é a vacina obrigatória para bezerras com idade entre 3 e 8 meses (BRASIL, 2006).

Esta amostra sofreu uma mutação espontânea no gene *ery*, com deleção de 702 pares de base (pb), ocorrendo a inibição do crescimento desta na presença de eritritol (PEREIRA, 2011). O uso preferencial pelo eritritol é característica do gênero *Brucella spp.* (ADANS, 1990) Porém, na Índia foram observadas amostras vacinais B19 que não apresentam essa deleção, mostrando a importância da genotipagem do gene *ery* nas vacinas comercializadas no Brasil (PEREIRA, 2011). Acredita-se que estirpes de B19 tolerantes seja uma das causas do desenvolvimento de infecção persistente pela mesma, e subsequente abortamento (SANGARI et al., 2000).

A recomendação usual da B19 é para fêmeas entre três a oito meses de idade, no entanto raças de bovinos leiteiros amadurecem mais cedo, podendo apresentar reação sorológica positiva

se analisadas antes dos 24 meses conforme normas do PNCEBT. Nestes casos é recomendada a vacinação entre três e seis meses de idade (HARREL, 1997).

A persistência desses anticorpos está relacionada com a idade de vacinação. Se as fêmeas forem vacinadas com idade superior a 8 meses, há grande probabilidade de produção de anticorpos que perdurem e interfiram no diagnóstico da doença após os 24 meses de idade. Quando a vacinação ocorre até os 8 meses de idade, tais anticorpos desaparecem rapidamente, e os animais acima de 24 meses são totalmente negativos nas provas sorológicas (BRASIL, 2006). Admite-se que fêmeas vacinadas com a vacina B19 na idade correta estarão protegidas por um período de sete anos após a vacinação (BATHKE, 1988).

A dose padrão única tradicionalmente recomendada é de  $5 \times 10^{10}$  células, via subcutânea (OIE). Adans (1990), refere que o grau de proteção pode variar dependendo da idade da fêmea, via de aplicação, dose da vacina, dose de desafio, mas, se utilizada de forma convencional, protege de 60 a 75% contra o abortamento. As falhas de vacinação estão relacionadas principalmente a altas doses de contato com o agente e não a um aumento na virulência do microorganismo (CRAWFORD et al., 1988).

A vacinação de fêmeas prenhes pode provocar abortamento, sobretudo no seu terço final, na ordem de 1% a 2,5% em condições de campo (MACDIARMID, 1999). Portanto, não se recomenda a vacinação de fêmeas gestantes com a amostra B19 (BRASIL, 2006).

O inconveniente da vacina B19 é a presença da cadeia O do lipopolossacarídeo, que induz a formação de anticorpos nos primeiros meses pós vacinação, além do que é patogênica para bovinos machos e outras espécies incluindo o homem (OMS, 1986).

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

A proteção induzida pela vacinação de animais adultos é comparável ou maior que a resposta induzida pela vacinação em novilhas (ALTON, et al., 1980), e tais achados tem levado à vacinação de animais adultos com a dose reduzida da cepa B19 em programas de controle da brucelose em outros países. No entanto, este tipo de vacinação pode levar a títulos de anticorpos persistentes, infecções induzidas pela cepa B19 e abortamentos (PACHECO, 2007).

Pacheco (2007) identificou através da técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) excreção de *Brucella* spp. da estirpe vacinal B19 em amostras predominantemente no momento do cio, aos 150 dias de gestação e no pós-parto imediato. A persistência da excreção foi observada em fêmeas bovinas de até nove anos de idade.

Durante a vacinação, devem ser adotadas certas precauções quanto à proteção individual (uso de óculos de proteção, luvas, etc.) e quanto ao descarte de seringas e frascos de vacinas (BRASIL, 2006). A vacina tem sido utilizada com resultados flutuantes que vão desde ótimo até a um baixo nível de proteção. Esta flutuação está vinculada à qualidade do produto, aos cuidados com refrigeração e as características da estirpe vacinal comercial (WHO, 1997).

O objetivo da utilização da B19 é baixar a taxa de infecção em zonas de alta prevalência, quando a cobertura vacinal atinge 80%, a prevalência da doença estará em níveis inferiores a 2% (OMS, 1986).

### **2.11.1.2 Vacina não indutoras de anticorpos aglutinantes (amostra RB 51)**

A necessidade de se obter uma amostra vacinal que eliminasse o principal inconveniente da B19, que é o de induzir a produção de anticorpos que interferem no imunodiagnóstico, fez com que muitos pesquisadores procurassem alternativas que pudessem superar esta dificuldade (LAGE et al, 2008). A estratégia foi desenvolver amostras rugosas de *B. abortus* que não possuíssem o antígeno-O do LPS, componente da parede bacteriana, responsável pela indução de anticorpos que interferem no diagnóstico sorológico. O melhor resultado até o momento foi o desenvolvimento da amostra rugosa de *B. abortus* RB51 e que não reverte para morfologia lisa mesmo após sucessivas passagens *in vivo* e *in vitro*, derivada da amostra lisa e virulenta S2308 de *B. abortus*, obtida por passagens em meios de cultura contendo doses sub-inibitórias de rifampicina. A sigla origina-se do R de rugosa, B de *Brucella* e o número 51 da nomenclatura interna utilizada no laboratório durante o processo de seleção (SCHURIG et al, 1991; BASTOS, 2011).

A vacina RB51 é destituída de cadeia O, apesar de alguns estudos a verificarem em baixos níveis, portanto, usualmente, não induz a produção de anticorpos anti-cadeia O, que são detectados em testes sorológicos convencionais usados no diagnóstico de brucelose, independente da dose, idade e frequência das inoculações (SCHURIG et al., 1991; SCHURIG et al., 2002).

No ano de 2007 foi aprovado a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA no 33 (28/08/2007) que regulamentou o uso da vacina RB51 restringindo sua administração para fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 entre 3 e 8 meses de idade e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007). Desde então, a amostra vacinal RB51 passou a ser utilizada como alternativa para a amostra vacinal B19, como uma vacina para prevenção da brucelose e abortos em bovinos, pois os animais vacinados com RB51 mostraram maior resistência à infecção e uma diminuição da

incidência de aborto quando foram experimentalmente infectados com a amostra virulenta S2308 de *B. abortus* (BASTOS, 2011).

As amostras rugosas de *B. abortus* apesar de apresentarem pouca ou nenhuma habilidade para induzir anticorpos contra a cadeia O, são capazes de provocar significativa proteção contra a infecção por *B. abortus*, indicando que estas amostras podem ser utilizadas para conferir uma boa resposta imune evitando os problemas de diagnóstico já referidos (CAVALLERO, 1998).

Em estudo realizado por Palmer e colaboradores (1997), verificou-se que fêmeas gestantes podem com segurança ser vacinadas com RB51, via subcutânea, sem subsequente aborto ou placentite, entretanto, Cavallero (1998) afirmou que apesar da amostra ser bastante atenuada, apresenta uma capacidade reduzida de produzir aborto.

Seu efeito protetor em uma única dose é similar a da amostra B19, e trabalhos de campo, tanto em áreas de alta como de baixa prevalência indicam que a proteção da amostra RB51 (pelo menos um ano após a vacinação) é similar ou superior que a obtida pela amostra B19 (CAVALLERO, 1998), e em fêmeas gestantes, a vacina induz respostas humoral e mediada por células (PALMER et al., 1997). Porém, esta amostra tem a desvantagem de ser resistente à rifampicina, um dos antibióticos usados no tratamento contra a brucelose humana (WHO, 1997).

Atualmente, a vacina não indutora de anticorpos aglutinantes (amostra RB51) é a vacina oficial do programa de controle de brucelose dos EUA, do México e do Chile. Também está aprovada em outros países onde vem sendo utilizada. No Brasil, será empregada para a vacinação estratégica de fêmeas adultas. Por ser uma vacina viva, o seu manuseio exige as mesmas precauções da B19, já referidas (BRASIL, 2006).

O uso da RB51 é recomendado somente em regiões de baixa prevalência da doença, de preferência, quando o combate da doença já estiver em fase de erradicação; pois em locais onde a brucelose é endêmica e apresentar alta prevalência, a vacina de escolha deve ser a B19 (OLSEN; STOFFREGEN, 2005). Entre o período final de 2007 e início de 2008, foram ofertados ao mercado brasileiro os primeiros lotes de duas vacinas comerciais (Vacina RB51-Laboratório Schering Plough e Brucelina 51-Laboratório Vallé) licenciadas junto à Coordenação de Produtos Veterinários (CPV) do MAPA. Até o presente momento as vacinas com as amostras B19 são as recomendadas pelo MAPA para vacinação de rotina em bezerras de três a oito meses, sendo restrito o uso da amostra RB51.

## **2.12 DOENÇA NO SER HUMANO**

A brucelose humana é uma doença importante, mas de difícil diagnóstico porque apresenta sintomatologia inespecífica. O homem se infecta pelo contato com animais positivos ou indiretamente pela ingestão de produtos de origem animal bem como pela inalação de aerossóis

infectantes. A doença produzida pela *B. abortus* – agente mais difundido no nosso meio e responsável pelo real problema da brucelose bovina no país –, na grande maioria das vezes é caracterizada por sintomas inespecíficos, presentes nos processos bacterianos generalizados nos quais se destacam a febre, a sudorese noturna, e as dores musculares e articulares (ACHA, 2001; BRASIL, 2006).

A brucelose é uma zoonose que apresenta um forte componente de caráter ocupacional: tratadores e veterinários, magarefes, profissionais que manuseiam a vacina bem como laboratoristas que manipulam grandes massas bacterianas na produção de vacinas e antígenos. Em geral, o tratamento é feito pela administração de uma associação de antibióticos por seis semanas. As drogas mais utilizadas são tetraciclinas, doxiciclina e rifampicina. Convém salientar que em caso de infecção acidental com a amostra RB51, o uso da rifampicina não é indicado (BRASIL, 2006).

Países que adotaram programas de combate à brucelose animal registraram quedas rápidas e acentuadas nas taxas de incidência de brucelose humana, e esse é o caminho para evitar essa infecção, que, mesmo não sendo tão disseminada na população humana, pode dar origem a enfermidade grave, com sérias implicações para as pessoas acometidas (MATHIAS, 2008).

### **3 OBJETIVOS**

Verificar a segurança da vacina de brucelose, cepa rugosa, em dose total, para fêmeas bovinas em diferentes períodos da gestação.

Estabelecer uma nova possibilidade de controle da doença pela imunização de fêmeas gestantes.

#### 4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v.1.

ADAMS, L. G. et al. Development of live Brucella vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed). **Advances in brucellosis research**. Texas A & M University Press, 1990. p.251-276.

ALTON, G.G. et al. Vaccination of pregnant cows with low doses of Brucella abortus strain 19 vaccine. **Aust Vet Journal**, Austrália, v. 56, n. 8, p. 369-372, ago. 1980.

ALTON, G.G. et al. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 190p.

BASTOS, R. et al. Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 10, p. 957-962, Out. 2012.

BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose. São Paulo: Roca, 1988. v.2, p.144-160

BAUMGARTEN, D. Brucellosis: A short review of the disease situation in Paraguay. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.90, p.63-69, dez. 2002.

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

BRASIL 2007. Instrução Normativa No 33 de 24 de Agosto de 2007. Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina viva não indutora de formação

de anticorpos aglutinantes, amostra RB51 (PNCEBT), [do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF]. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 jun. 2007. p.1-6

BREW, S.D. et al. Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal. **Vet. Rec.**, Reino Unido, v.144, n.17. p.483, abr. 1999.

CAMPERO, C.M. Brucelosis en toros: una revisión. **Veterinary Medicine**, Buenos Aires, v. 74, n.1, p. 8-14, out. 1993.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **J. Infect.**, Itália, v.45, n. 2, p.122-127, ago. 2002.

CAVALLERO J. C. M. Enfermidades causadoras de aborto: brucelose. In: LEMOS R. A. A. A. (ed). **Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 1998. 536 f.

CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. **Surveillance**, França, v.16, n.2, p.3-5, jan. 1989.

CHEERS, C.; HO, M. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Functional specificity in natural resistance to facultative intracellular bacteria. **J Reticuloendothel Soc**, Washington, v. 34, n. 4, p. 299-309. mar. 1983.

CORBEL, M. J.; BRINLEY-MORGAN, W. J. Genus Brucella. In: KRIEG, N. R.; HOLD, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 377-388.

CORBEL, M.J. Brucellosis: An overview. **Emerg. Infect. Dis.**, Reino Unido, v.3, n.2, p.213-221, abr-jun. 1997.

CORBEL, M.J.; ELBERG S.S.; COSIVI, O. (Ed.). **Brucellosis in humans and animals**. Geneva: WHO Press, 2006. 89p.

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

CUTLER, S.J., WHATMORE, A.M., COMMANDER, N.J. Brucellosis – new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v.98, n.6., p.1270–1281, Mai. 2005.

DIAS, R.A. **Caracterização especial da brucelose bovina no Estado de São Paulo**. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) FMVZ- USP, São Paulo, 2004.

ENRIGHT, F.M. **Animal Brucellosis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p.301-320.

FERREIRA NETO, J.S. **Situação epidemiológica da brucelose no Brasil**: Centro colaborador do MAPA para a saúde animal. ago. 2010.

FOSTER, G. et al. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reino Unido, v.57, n.1, p.2688-2693, nov. 2007.

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

GITTI, C. **Aprovado Teste de Polarização Fluorescente para o Diagnóstico da Brucelose Animal**. Disponível em: <<http://sanidaderural.blogspot.com.br/2010/10/aprovado-teste-de-polarizacao.html>>. Acesso em 10 ago. 2014.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, Bélgica, v. 21, n 2, p 277-286, ago. 2002.

GODFROID, J. KASBOHRER, A. Brucellosis in European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. **Veterinary Microbiology**, Bélgica, v 90, n.4, p. 135-145, dez. 2002.

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

LUCAS, A. **Simulação do impacto econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões Centro-oeste, Sudeste e Sul do Brasil**. 2006. 122f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia) USP, 2006.

LUNA-MARTINEZ, J. E., MEJIA-TERAN, C. Brucellosis in México: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, México, v.90, n.4, p 19-30, dez. 2002.

MACDIARMID, S.C. **Bovine brucellosis eradication and surveillance strategies in pastoral dairy and beef cattle production**. Wellington: National Adviser (Animal Health), Ministry of Agriculture and Fisheries (MAF), 1999.

MATHIAS, L.A. Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. **Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, p.47-48, jul./dez. 2008.

MATHIAS, L.A. et al. Validação interlaboratorial do teste de polarização fluorescente para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2135-2140, out. 2010.

McDONALD, W.L. et al. Characterization of a Brucella sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. **J. Clin. Microbiol.**, Nova Zelândia, v.44, n.12, p.4363-4370, out. 2006.

McGIVEN, J. et al. The improved specificity of bovine brucellosis testing in Great Britain. **Res. Vet. Sci.**, Reino Unido, v.84, n.1, p.38-40, abr. 2008.

MEGID, Jane et al. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 395-399, ago. 2000.

MINERVINO, A. H. H. et al. Estudo retrospectivo da ocorrência de bovinos soro reagentes à brucelose no estado do Pará. **Acta Veterinaria Brasilica**, Rio Grande do Norte, v.5, n.1, p.47-53, jan/jun. 2011.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Vet. Microbiol.**, Costa Rica, v.90, n.1-4, p.31-38, dez. 2002.

NEGREIROS, R.L. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Minas Gerais, v.61, n.1, p.56-65, set. 2009. Suplemento.

NIELSEN, K. et al. **Immunoassay development: application to enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis**. Nepean, Ontario: Animal Disease Research Institute. O.I.E. Reference Laboratory of Brucellosis. Agriculture and Agri- Food Canada, 1996.

NIELSEN, K. et al. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Vet. Microbiol.**, Canada, v.21, n.80, n.2, p.163-170, Maio. 2001.

OGATA, R.A. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Minas Gerais, v.61, n. 1, p.126-134, nov. 2009. Suplemento.

OIE. Organización Internacional de Epizootias. Disponível em: <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2014>>. Acesso em 18 jun. 2014.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Brucelosis bovina, ovina y ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIES. Código zoonosológico internacional, Enfermedades dos bovinos da lista B, Recomendações aplicáveis à enfermidades específicas. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>> Acesso em: 8 jun. 2014.

OLSEN, Steven C.; STOFFREGEN, W. S. **Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock**, 2005.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. **Sexto informe**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1996. (Série de Informes Técnicos, 740).

OSÓRIO, A. L.A.R., MONTEIRO, L.A.R.C. **Brucelose bovina**. Campo Grande: Ed. UFMS, 2006. p. 9-57 (Qualificação rural).

PACHECO, W.A. **Excreção da Brucella abortus, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação como ciclo reprodutivo**. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ- USP, São Paulo, 2007.

PALMER, M.V; OLSEN, S.C, CHEVILLE, N.F. Safety and immunogenicity of Brucella abortus strain RB51 vaccine in pregnant cattle. **Am J Vet Res**, Estados Unidos, v.58, n.5, p.472–7, Maio 1997.

PAULIN, L.M. et al. Estudo comparativo dos testes 2- Mercaptoetanol e Reação de Fixação do Complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.4, p.41-47, out./dez. 2002.

PAULIN, L.M. Artigo de revisão. Brucelose. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, abr./jun. 2003.

PAULIN, L.M.; FERREIRA, J.S. **Combate à Brucelose Bovina: Situação Brasileira**. Jaboticabal: Funep, 2003.154p.

PEREIRA, R.R.B. **Avaliação genética e residual das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil**. 2011. 55f. Tese (Mestrado em Ciência Animal). UFMS, Campo Grande-MS, 2011.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n.1-4, p.55-62, dez. 2002.

POESTER, F.P., SAMARTINO, L.E., LAGE, A.P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Cad. Tec. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, v.24, n. 47, p.13-29, Abr. 2005.

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

POESTER, F.P. **Manual de Zoonoses: Programa de Zoonoses região Sul**. [S.l.: s.n.], 2009. v.1, p.9-20.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolf publishing, 1994. 648 p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Vetrinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAGAN, V. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS): Brucellosis eradication program in the Unites States. **Vet. Microbiol.**, Estados Unidos, v.90, n.1-4, p.11-18, dez. 2002.

RICHEY, E. J.; HARRELL, C. D. Brucella abortus disease (Brucellosis) in beef cattle. 1997. Disponível em: [http://www.floridacattleranch.org/ifas\\_brucellosis.pdf](http://www.floridacattleranch.org/ifas_brucellosis.pdf) Acesso em: Acesso em 18 jun. 2014.

ROE, R.T., MORRIS, R.S. The integration of epidemiological and economic analyses in the planning of the Australian brucellosis eradication programme. In: International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings, 1976, Inglaterra. **Anais...** Inglaterra, 1976.

ROSENBERGER, C.M.; FINLAY, B.B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. **Nature Reviews**, Canada, v. 4, n. 5, p. 385-396, Mai. 2003.

ROSINHA, G.M.S. **Brucelose bovina: desafios e perspectivas.** Disponível em: <[http://famasul.com.br/artigos\\_interna/brucelose-bovina-desafios-e-perspectivas.](http://famasul.com.br/artigos_interna/brucelose-bovina-desafios-e-perspectivas.)> Acesso em 11 jun. 2014.

SAMARTINO, L.E. Brucellosis in Argentina. **Vet. Microbiol.**, Buenos Aires, v.90, n.1-4, p.71-80, dez. 2002.

SANGARI F.J., AGÜERO J., GARCIA-LOBO J.M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in Brucella abortus. **Microbiology**, Espanha, v.146, n.2, p.487-495, fev. 2000.

SCHOLZ, H. C. et al. Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 801-808, abr. 2010.

SCHOLZ, H.C. et al. Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Alemanha, v.58, n.2, p.375-382, fev. 2008.

SCHURIG, G.G. et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. **Vet Microbiol**, Blacksburg, v.28, n.2, p.171-188, jul. 1991.

SCHURIG G.G., SRIRANGANATHAN N., CORBEL M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Vet Microbiol**, Virginia, v.90, n.1-4, p.479-496, dez. 2002.

SELEEM, M.N.; BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, Blacksburg, v.140, n.3-5, p.392–398, jan. 2010.

SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p.103-108, nov. 2009. Suplemento.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of Brucella. **Crit Rev Microbiol**, Califórnia, v. 17, n. 3, p. 209-229, jan. 1990.

SOHN, A.H. et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp. **Emerg. Infect. Dis.**, Califórnia, v.9, n.4, p.485-488, abr. 2003.

STEVENS, M.G.; OLSEN, S.C.; CHEVILLE, N.F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 or strain RB51. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Estados Unidos, v. 44, n.3-4, p. 223- 235, fev. 1995.

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

VASCONCELOS, S.A.; ITO, F.H.;CORTES, J.A. As bases para a prevenção da brucelose animal. **Comun. Cienc. Fac. Med. Vet. Zootec. da USP**, São Paulo, v.11, n.1, p.25-36, out. 1987.

VERGER, J.M. et al. Taxonomy of the genus Brucella. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol**, Suécia, v.138, n.2, p.235–238, mar/abr. 1997.

WERLING, D.; JUNGI, W. TOLL-like receptors linking innate and adaptative immune response. **Vet Immunol and Immunopathol**, Suíça, v. 91, n. 1, p. 1-12, jan. 2003.

WHO - World Health Organization Joint FAO/WHO. **Expert Committee on Brucellosis: The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of a WHO Meeting**. Geneva, 1997.

WRIGHT, P. F.; NIELSEN, K. H. Current and future serological methods. Advances in brucellosis research. Texas: A&M University Press, College Station, Tex, 1990. p. 305-320.

WYATT, H.V. Royal Navy surgeons and the transmission of brucellosis by goats' milk. **Journal of Royal Naval Medical Service**, Reino Unido, v.85, n.2, p.112-117, fev. 1999.

**5 CAPÍTULO 1: Manuscrito a ser enviado á revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.**

**Uso da vacina cepa rugosa contra brucelose em fêmeas bovinas em diferentes estágios de gestação**

Carlos Antônio de Carvalho Fernandes<sup>(1,2)</sup>; Adriana Agostini Brabosa<sup>(1,2)</sup>

<sup>1</sup>University of Alfenas, UNIFENAS - Alfenas-MG, Brazil.

<sup>2</sup>Biotran LTDA – Alfenas-MG, Brasil.

e-mail: [carlos@biotran.com.br](mailto:carlos@biotran.com.br)

Resumo – Objetivou-se avaliar a segurança da vacina com a cepa RB51 em fêmeas bovinas em diferentes estágios de gestação. Foram utilizadas 96 fêmeas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*), em três períodos gestacionais (terço inicial: TI, médio: TM e final: TF), divididas aleatoriamente em dois grupos, tratado e controle (T e C), constituindo seis tratamentos. Comparou-se entre os grupos, utilizando o teste de  $X^2$  a 5% de significância, as variáveis: gestação à termo; bezerros vivos aos 60 dias e a ocorrência de bezerros soropositivos. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos quando os períodos foram analisados em conjunto e nem quando individualizados. Como conclusão, o presente estudo sugere que a vacina utilizada é segura para fêmeas bovinas em qualquer fase da gestação, não induzindo abortos.

Termos de indexação; aborto, vacinação, gestação, brucelose.

### **Use of vaccine against brucellosis cepa rough in female bovine in different stages of pregnancy**

Abstract –. The purpose of this study was evaluated the safety of the vaccine RB51 strain in with the female cattle at different stages of pregnancy. 96 females crossbred (Bos taurus x Bos indicus) were used in three gestational periods (initial trimester: TI, midterm: TM and final trimester: TF), randomly divided into two groups, control and treated (T and C), constituting six treatments . The groups were compared to each other , using the X2 test at 5% significance, the variables: term pregnancy; calves alive at 60 days and the occurrence of seropositive calves. No differences were observed among treatments when the periods were analyzed together nor when individualized. In conclusion, this study suggests that the vaccine used is safe for female cattle at any stage of pregnancy, not inducing abortions.

Index terms: abortion, vaccination, brucellosis, pregnancy.

## Introdução

A brucelose bovina é uma doença infecto contagiosa crônica, altamente transmissível, causada por bactérias do gênero *Brucella*. É uma zoonose, distribuída mundialmente e que acomete principalmente fêmeas em idade reprodutiva (Thoen *et al.*, 1993; Campanã *et al.* 2003).

A brucelose está na lista das doenças de notificação obrigatória da Organização Internacional de Epizootia (OIE, 2008). As perdas provocadas pela brucelose na pecuária estão diretamente ligadas ao abortamento, queda na produção de carne e leite, aumento do intervalo de partos, morte de bezerros e ainda aumento na taxa de reposição de animais (Paulin, 2006b; Miranda *et al.*, 2008;).

A via oral (trato digestivo) é a mais importante porta de entrada da *Brucella abortus*. A infecção ocorre com a ingestão de água e alimentos contaminados com produtos de aborto, fetos, descargas uterinas e restos placentários, sendo também importante a via aerógena. A forma principal de disseminação da doença, coloca as fêmeas gestantes como agentes principais na transmissão (Acha e Szyfres, 2003). O curso da enfermidade vai depender do estágio fisiológico do animal. Animais jovens, antes da puberdade, parecem ser mais resistentes à infecção (Crawford *et al.*, 1990). Quando o animal se torna gestante, as bactérias atingem o útero, local pelo qual possuem grande tropismo, provocando, dessa forma, o aborto, natimortos e nascimento de bezerros fracos (Samartino e Enright, 1993).

A brucelose tem grande importância socioeconômica e de saúde pública para o Brasil, podendo levar a barreiras sanitárias no comércio internacional de animais e seus produtos (Pereira, 2011). Por isso, programas de controle e erradicação da Brucelose foram implementados e segundo a OIE são recomendadas vacinas boas indutoras de imunidade celular como as vacinas B19 e RB51 (Brasil, 2005).

As fêmeas gestantes possuem papel de relevância na disseminação da doença. Uma enorme quantidade de *B. abortus* é eliminada durante o aborto e parto de animais infectados e estes, por sua vez, continuam eliminando a bactéria nas secreções uterinas por aproximadamente 30 dias, contaminando pastagens, água, alimento e fômites (Crawford *et al.*, 1990; Brasil, 2006). Adicionalmente, a vacinação em dose única com a cepa B19 protege apenas entre 60 a 75% contra o abortamento (Crawford *et al.* 1988),

além de fornecer proteção por no máximo sete anos pós vacinação (Bathke, 1988). Assim sendo, alternativas complementares de imunização são importantes.

No Brasil, a partir de 2001, a doença se tornou de notificação obrigatória e a imunização compulsória de fêmeas entre três e oito meses de idade e com a vacina B19 foi instituída pelo PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose). Seis anos mais tarde, segundo a Instrução Normativa (IN) DAS-MAPA nº 33 (24/08/2007), o uso da vacina RB51 foi regulamentada com algumas restrições. Sua utilização está indicada para fêmeas com idade superior a oito meses que não foram vacinadas com a amostra B19 anteriormente; ou em fêmeas adultas não reagentes aos testes diagnósticos que se encontrem em estabelecimentos de criação com focos de brucelose. É proibida sua utilização em bovinos machos de qualquer idade e em fêmeas até oito meses de idade e em fêmeas gestantes (Brasil, 2007).

Deve-se salientar que as estirpes de *B. abortus* de campo, assim como as vacinas feitas com cepas lisas, induzem a produção de anticorpos específicos que interferem no diagnóstico de rotina. Este fato torna difícil a distinção entre animais vacinados e animais infectados pela maioria dos testes sorológicos (Pellegrin *et al.*, 2006). A abordagem para evitar a interferência sorológica no diagnóstico é por meio de uma vacina que não induz anticorpos contra o lipopolissacarídeo “O” (O-LPS). A cepa *B. abortus* que não é indutiva de anticorpos aglutinantes foi isolada na década de 80. Tal vacina oferece proteção sem interferir com os métodos sorológicos habituais, mesmo em vacas adultas (Stevens *et al.*, 1995; Cheville *et al.*, 1996).

Alguns países adotaram programas de vacinação em massa utilizando a vacina com a cepa rugosa em todas as categorias animais. Nos Açores, a incidência média de brucelose no rebanho, a prevalência no rebanho e a prevalência no indivíduo diminuíram 69,26%, 39,26% e 75,41% respectivamente após a instituição da vacinação em massa com a RB51 (Martins, 2009). De forma semelhante, Sanz *et al.* (2010) relatou o controle de um surto de brucelose bovina na Espanha com a vacinação de 40.000 animais, demonstrando a utilidade da imunização em massa, incluindo vacas gestantes, em áreas onde a doença não pode ser contida através de abordagens mais conservadoras. Deve-se salientar, porém, que o uso de doses normais em vacas prenhes não é recomendado por vários fabricantes de diferentes países. Tal situação leva a falhas potenciais dos programas de imunização. Informações da literatura não permitem

afirmar se tal vacina em doses normais é segura quando administrada a vacas prenhes (Poester *et al.*, 2000).

Visando determinar a possibilidade de aumentar a proteção numa categoria animal que têm grande importância na epidemiologia da brucelose, este estudo objetivou avaliar a segurança de uma vacina com dose completa feita de uma estirpe não indutiva de anticorpos aglutinantes ( $1,0-3,4 \times 10^{10}$  UFC - BRUCELINA REBECCIN® - Vallée - Brasil), em vacas gestantes em diferentes estágios de gestação.

### **Material e Métodos**

O estudo teve duração de um ano e incluiu fase de gestação, pré-parto, parto até o período de dois meses de idade. Neste período os bezerros foram submetidos ao teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) para confirmação da inexistência de resposta sorológica a este teste.

Foram utilizadas 96 fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*), vacas e novilhas gestantes, em períodos de gestação pré-determinados. Em cada período de gestação (terço inicial TI, terço médio TM e terço final TF), as fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, tratado e controle, totalizando seis tratamentos com 16 animais cada (tab1). O peso dos animais utilizados variou de 322 a 590 kg, e o escore de condição corporal entre 3,5 a 4,5 (escala de 1 a 5) segundo Edmonson et al, (1989).

As fêmeas participantes apresentavam marcação na face do lado esquerdo identificando a vacinação com B19. Todas as fêmeas foram examinadas 30 dias antes do início do estudo de acordo com as normas do PNCEBT para brucelose e tuberculose de acordo com a Instrução Normativa SDA nº 06, de 08 de janeiro de 2004 (BRASIL,2006). A gestação dos animais foi confirmada com o auxílio da ultrassonografia (MINDRAY DP2200) com transdutor transretal linear.

Todos os animais foram previamente imunizados contra algumas enfermidades cujo principal sinal clínico é o aborto (Leptospirose, IBR e BVD- Cattle Master Gold® laboratório Zoets) no momento da aquisição desses animais e com reforço 30 dias após a primeira dose e aos 60 dias de gestação. Os animais foram mantidos em pastagens de capim *Brachiária decumbens* com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Tabela 1: Distribuição das fêmeas em diferentes fases de gestação e tratamento.

<b>Fase da Gestação</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Tempo médio de gestação</b>	<b>Tratamento</b>
TI (45 - 90 dias)	Controle	16	82	Não tratado
	Tratado	16	84	Brucelina Rebeccin <sup>®</sup>
TM (95 - 180 dias)	Controle	16	163	Não tratado
	Tratado	16	177	Brucelina Rebeccin <sup>®</sup>
TF (185 - 270 dias)	Controle	16	229	Não tratado
	Tratado	16	236	Brucelina Rebeccin <sup>®</sup>

TI- terço inicial TM- terço médio TF- terço final

Os animais do grupo tratado receberam pela via subcutânea 2 ml da vacina. Aquelas do grupo controle foram manejadas, porém não receberam qualquer tratamento. A vacina utilizada foi fornecida pelo Laboratório Vallée e recebe a denominação de BRUCELINA REBECCIN<sup>®</sup> partida número 001/12. Foram utilizadas seringas de 5 ml estéreis e agulha 30x8 para sua aplicação que foi realizada na região cervical do lado direito do animal. Os animais foram avaliados durante todo o período de gestação.

As datas dos partos foram anotadas e, quando os bezerros atingiam 60 dias de idade, amostras de sangue foram colhidas da artéria coccígena para obtenção de 1 ml de soro para realização do AAT.

Comparou-se o total de gestações à termo, o número de bezerros vivos aos 60 dias de idade e a ocorrência de animais soropositivos acima dos 60 dias de idade ao teste AAT. Comparou-se entre os grupos utilizando o teste  $X^2$  a 5% de significância nas referidas variáveis.

## Resultados e Discussão

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos controle e tratados ou quando os períodos foram analisados em conjunto para as variáveis avaliadas: gestações à termo,

bezerros vivos aos 60 dias e sorologia positiva de bezerros submetidos ao teste do AAT aos 60 dias de vida.

Algumas fêmeas que perderam a gestação, conforme segue na tabela 2, em ambos os tratamentos não foram imediatamente identificadas devido ao manejo. Tal fato foi confirmado através de palpação transretal, 60 dias pré-parto. As perdas evidenciadas a partir da gestação considerada à termo foram atribuídas à partos em períodos noturnos, sem acompanhamento.

Tabela 2: Número e percentual de gestações à termo em diferentes grupos e períodos de gestação.

Fase da gestação	Gestação à termo			
	Grupo controle		Grupo Rebeccin <sup>®</sup>	
	N	%	N	%
TI	14/16	87,5	15/16	93,8
TM	14/16	87,5	13/16	81,3
TF	15/16	93,8	16/16	100,0
<b>Total</b>	<b>43/48</b>	<b>89,6</b>	<b>44/48</b>	<b>91,7</b>

TI- terço inicial TM- terço médio TF- terço final

A ausência de abortos em animais gestantes após imunização com com RB51 foi relatado anteriormente por estudos em outros países (Palmer et al., 1997; Uzal et al., 2000; Samartino et al., 2003). Por outro lado, Sanz *et al.* (2010), ao analisar a vacinação em massa com RB51 durante 5 anos na Espanha, relataram a ocorrência de 897 abortos em 20.000 animais vacinados, sendo que apenas 78 desses casos foram associados a vacinação com a RB51 (Sanz *et al.*, 2010).

Estudos relatam que a proteção conferida aos animais pela B19 é similar à proteção com a cepa RB51 (Cheville, 1993, Poester *et al.*, 2006), a última não interferindo porém nos testes de diagnóstico (Palmer *et al.*, 1996). Um estudo com novilhas vacinadas com RB51 e posterior desafio experimental durante o 6<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> mês de gestação, comprovou que a vacinação diminuiu significativamente a taxa de aborto em relação ao grupo controle (Poester *et al.*, 2006), comprovando a eficiência da imunização.

O presente estudo não encontrou diferença entre o grupo tratado e o grupo controle em relação à taxa de aborto, mostrando que a vacina utilizada pode ser usada com segurança em vacas gestantes em qualquer fase da gestação, sem indução de aborto.

Além disso, não foi encontrado bezerro soropositivo aos 60 dias de idade, confirmando a não interferência nos testes de diagnóstico tanto no produto quanto na fêmea (Mathias *et al*, 2001; Brasil, 2006; Poester *et al*, 2006; Pacheco, 2007) . Tal resultado foi demonstrado anteriormente por Poester *et al*. (2006) e Poester *et al*. (2010) em estudos avaliando sistematicamente animais vacinados com a RB51, comprovando que tais animais, tanto as fêmeas quanto os produtos, não apresentaram resultado positivo para o diagnóstico de brucelose nos testes preconizados pelo PNCEBT. Deve-se salientar ainda que, mesmo quando utilizada em dose reduzida, a vacina com a cepa B19 interfere no diagnóstico até três meses após a vacinação (Jardim, 2006).

Tabela 3: Número total de bezerros vivos aos 60 dias de idade, provenientes de fêmeas soronegativas que receberam ou não a vacina BRUCELINA REBECCIN® em diferentes períodos da gestação.

Fase da gestação	Grupo controle		Grupo Rebeccin®	
	N	%	N	%
TI	12/14	75,0	14/15	87,5
TM	14/14	87,5	13/13	81,3
TF	14/15	87,5	15/16	93,8
<b>Total</b>	40/43	83,3	42/44	87,5

TI- terço inicial TM- terço médio TF- terço final

Dessa forma, a aplicação da vacina, utilizada em qualquer fase da gestação, não afeta a viabilidade e sanidade dos bezerros após o nascimento. Estes resultados sugerem que a vacina contra brucelose cepa rugosa utilizada na dose convencional ( $1,0 - 3,4 \times 10^{10}$  UFC) é segura para vacas gestantes em qualquer fase de gestação. Assim sendo, pela importância das fêmeas gestantes na transmissão da brucelose e pelo fato que a vacinação única com B19 em bezerras entre 3 a 8 meses não confere proteção vitalícia (Bathke, 1988), os achados deste estudo tem grande relevância e potencial de aplicação imediata no controle desta doença.

### **Conclusão**

Concluiu-se que a administração da vacina contra brucelose cepa rugosa utilizada, em qualquer fase da gestação, é segura para fêmeas bovinas, não levando a perdas fetais nem interferindo com a viabilidade e sorologia dos bezerros após o nascimento.

### **Agradecimentos**

Apoio: FAPEMIG, CNPq e Vallée .

### **Referências**

ACHA P.N; SZYFRES B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3. ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003. 3v. (Scientific and Technical Publication, 580).

BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). **Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose**. São Paulo: Roca, 1988. v.2, p.144-160.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal**. Brasília: MAPA/DAS/DAS. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT**. Brasília, 2006.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 33 de 24 de agosto de 2007. **Estabelece as condições para a vacinação de fêmeas bovinas contra brucelose, utilizando vacina não indutora da formação de anticorpos aglutinantes, amostra RB51.**

CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina.** Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo. 2003, 20p.

CHEVILLE, N.F; STEVENS, M.G; JENSEN, A.E; TATUM, F.M; HALLING, S.M. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. **Am J Vet Res**, v.54, p.1591-1597, 1993.

CRAWFORD, R.P.; ADAMS, L.G.; CHILDERS, A.B. Value of serologic reactions following Starin 19 vaccination. **Prev. Vet. Med.**, v.5, p. 275-280, 1988.

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

EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T., WEBSTER, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.68-78, 1989.

JARDIM, G. C; PIRES, P. P; MATHIAS, L. A., RIBEIRO, O. C., KUCHEMUCK, R. G., Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n. 3, p 177-182, jul./set. 2006.

MARTINS, H., GARIN-BASTUJI, B., LIMA, F., FLOR, L., PINA FONSECA, A., BOINAS, F. Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal-Outcome of a 5-year programme (2002-2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. **Prev. Vet. Med.** v.90, p.80-89, 2009.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F; CHEN, A. A; GIRIO, R. J. S; NETO, W. V. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerras Nelore vacinadas aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n.4, p 139-142, out-dez, 2001

MIRANDA, K.L; ALVES, C.M; MINHARRO, S; LÔBO, J.R; MÜLLER, E.E; GONÇALVES, V.S.P; LAGE, A.P. Quem ganha com a certificação de propriedades livres ou monitoradas pelo PNCEBT? **Leite Integral**, v.3, p.44-55, 2008.

PACHECO, W.A. **Excreção da *Brucella abortus*, estirpe B19 pelo leite e urina de fêmeas bovinas de diferentes faixas etárias vacinadas contra brucelose e sua relação como ciclo reprodutivo.** 2007. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 69 f. FMVZ- USP, São Paulo.

PALMER, M. V.; CHEVILLE, N. F.; JENSEN, A. E. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. **Veterinary Pathology Online**, v. 33, n. 6, p. 682-691, 1996.

PALMER, M.V; OLSEN, S.C, CHEVILLE, N.F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. **Am J Vet Res**, v.58, p.472-477, 1997.

PAULIN, L.M.S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos ( *Bubalus bubalis*).** 2006.

92f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PELLEGRIN, A. O; LEITE, R. M. H; SERENO, J. R. B; LAGE, A. P; LEITE, R. C; RAVAGLIA, E. **Brucelose bovina no Pantanal Sul-Mato-Grossense: dados preliminares**. Comunicado técnico, 58, Corumbá/MS, dez./2006. Disponível em: [www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/cot58.pdf](http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/cot58.pdf). Acesso em 18 jun 2014.

PEREIRA, R.R.B. **Avaliação genética e residual das vacinas contra brucelose bovina comercializadas no Brasil**. 2011. 55f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

POESTER, F.P; RAMOS, E.T; GOMES, M.P; CHIMINAZZO, C; SCHURIG, G.G. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.37, p.61–64, 2000.

POESTER, F.P; GONÇALVES, V.S; PAIXÃO, T.A; SANTOS, R.L; OLSEN, S.C; SCHURING, G.G; LAGE, A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, v.24, p.5327-5334, 2006.

SAMARTINO, L.E; ENRIGHT, F.M. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.16, p.95-101, 1993.

SAMARTINO, L.E., SALUSTIO, E., GREGORET, R. Evaluación de La vacuna RB51 de *Brucella abortus* em hembras bovinas preñadas. In: JORNADA DE ACTUALIZACIÓN SOBRE BRUCELLOSIS BOVINA, 2003, Uruguai. **Anais...** Uruguai, 2003.

SANZ, C., SÁEZ, J. L., ALVAREZ, J., CORTÉS, M., PEREIRA, G., REYES, A., RUBIO, F., MARTIN, J., GARCIA, N., DOMÍNGUEZ, L., HERMOSO-DE-MENDOZA, M., HERMOSO-DE-MENDOZA, J. Mass vaccination as a complementary tool in the control of a severe outbreak of bovine brucellosis due to *Brucella abortus* in Extremadura, **Spain. Prev. Vet. Med.** v.97, p.119-125, 2010.

STEVENS, M.G; OLSEN, S.C; CHEVILLE, N.F. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. **Vet Immunol Immunopathol**, v.44, p.223–235, 1995.

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

UZAL, F.A., SAMARTINO, L., SHURIG, G., CARRASCO, A., NIELSEN, K., CABRERA, R.F., TADDEO, H.R. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. **Vet. Res. Commum**, v.24, p.143-151, 2000.

## 6 Anexos – Normas para Publicação – Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

A revista **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas, Novas Cultivares e Revisões a convite do Editor.

### **Análise dos artigos**

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

### **Forma e preparação de manuscritos**

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### **Título**

Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como efeito ou influência.

Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### **Nomes dos autores**

Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção e, y ou and, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

#### **Endereço dos autores**

São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

#### **Resumo**

O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.

Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

#### **Termos para indexação**

A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

Não devem conter palavras que componham o título.

Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ([http://www.fao.org/aims/ag\\_intro.htm](http://www.fao.org/aims/ag_intro.htm)) ou no Índice de Assuntos da base SciELO (<http://www.scielo.br>).

#### **Introdução**

A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

Deve ocupar, no máximo, duas páginas.

Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

#### **Material e Métodos**

A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.

Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

#### **Resultados e Discussão**

A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.

Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.

Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.

Dados não apresentados não podem ser discutidos.

Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.

As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.

Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.

Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.

Não podem consistir no resumo dos resultados.

Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.

Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### **Agradecimentos**

A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser breves e diretos, iniciando-se com Ao, Aos, À ou Às (pessoas ou instituições).

Devem conter o motivo do agradecimento.

### **Referências**

A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.

Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.

Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.

Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.

Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.

Devem ser trinta, no máximo.

#### **Exemplos:**

*Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)*

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

*Artigos de periódicos*

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

*Capítulos de livros*

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

*Livros*

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

*Teses*

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

*Fontes eletrônicas*

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: <<http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

### **Citações**

Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

A autocitação deve ser evitada.

Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir:

**Redação das citações dentro de parênteses**

Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão citado por e da citação da obra consultada.

Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

#### **Redação das citações fora de parênteses**

Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

#### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

#### **Tabelas**

As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.

Devem ser auto-explicativas.

Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna, devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.

Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

#### **Notas de rodapé das tabelas**

Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

#### **Figuras**

São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

Devem ser auto-explicativas.

A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura no título, ou entre a figura e o título.

Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.

Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

Não usar negrito nas figuras.

As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da **PAB**.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: [pab@sct.embrapa.br](mailto:pab@sct.embrapa.br) ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica

Pesquisa Agropecuária Brasileira ♦ PAB

Caixa Postal 040315

CEP 70770 901 Brasília, DF