

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA VACINA B19 PELO
TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO E
PCR EM BEZERRAS VACINADAS**

Leticia Marie Lira Umeda

CAMPO GRANDE, MS
2014

2014 AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA VACINA B19 PELO TESTE DO
ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO E PCR EM BEZERRAS VACINADAS
UMEDA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA VACINA B19 PELO
TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO E PCR
EM BEZERRAS VACINADAS
EVALUATION OF THE PERSISTENCE OF THE S19 VACCINE WITH
ROSE BENGAL TEST AND PCR IN VACCINATED CALVES**

Letícia Marie Lira Umeda

**Orientador: Prof. Dr. Cleber Oliveira Soares
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Grácia Maria Soares Rosinha**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS
2014

Certificado de aprovação

LETÍCIA MARIE LIRA UMEDA

**AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA VACINA B19 PELO TESTE DO
ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO E PCR EM BEZERRAS
VACINADAS**

**EVALUATION OF THE PERSISTENCE OF THE S19 VACCINE WITH ROSE BENGAL
TEST AND PCR IN VACCINATED CALVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

Aprovado (a) em: 28/02/2014

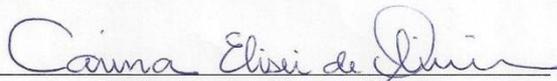
BANCA EXAMINADORA:



Doutor Cleber Oliveira Soares
(EMBRAPA/CNPGC/Orientador)



Doutora Eliane Mattos Piranda
(UFMS)



Doutora Carina Elisei de Oliveira
(UCDB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por sempre me apoiar, pela ajuda, paciência e compreensão.

Agradeço em especial a minha mãe, meu pai e Cleonice, pois sempre possibilitaram a aprimoração dos estudos.

Aos meus amigos, por estarem presentes nos momentos bons e ruins e por sempre me incentivarem a ir além.

Agradeço ao meu orientador Cleber Oliveira Soares e minha co-orientadora Grácia Maria Soares Rosinha, pela oportunidade de trabalho no laboratório de Engenharia Genética Animal e pelo aprendizado nesse período.

À amizade criada durante o período de mestrado, agradeço a Cheyenne, Cleber, Juliana, Cristiane, por sempre serem prestativos e por tornarem os dias mais alegres.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Engenharia Genética Animal e também a Goretti, por todo o apoio.

Ao Ramiro e aos funcionários do manejo animal, pela ajuda durante as coletas de sangue e por sempre serem prestativos.

Agradeço ao Dr Roberto Torres, por ceder os animais do melhoramento genético animal para as coletas de sangue.

A Embrapa Gado de Corte por ceder o local para a realização do experimento e ao CNPq pela bolsa de estudos.

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a
amargura da velhice”.*

Leonardo da Vinci

Resumo

Umeda, L. M. L. Avaliação da persistência da vacina B19 pelo Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e PCR em bezerras vacinadas. Ano. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* sp. são o agente etiológico causador da brucelose, uma zoonose de distribuição mundial. A brucelose é considerada uma das principais causas de aborto e esterilidade nos animais domésticos e as perdas econômicas estão relacionadas aos abortos, baixos índices reprodutivos, aumento no intervalo entre partos, diminuição na produção de leite e morte de bezerros. Objetivou-se avaliar a persistência da vacina B19 pelo método sorológico AAT (Teste do antígeno acidificado tamponado) e molecular PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em fêmeas bovinas vacinadas com idade entre seis a oito meses de idade. Quarenta e oito bezerras previamente não vacinadas contra brucelose foram acompanhadas por meio de coletas de sangue a cada 30 dias, antes e após a vacinação com a cepa B19 para a determinação da persistência da vacina nesses animais. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foram o B4 e B5. Todos os animais apresentaram resultados negativos ao teste do AAT na coleta antes da vacinação. Cinco animais apresentaram resultados negativos no AAT durante todo o período de coleta. O percentual de animais positivos ao teste do AAT ao longo do experimento foi de 80,65%, 66,6%, 20,83%, 10,42%, 6,25% aos 30, 90, 120, 150 e 180 dias após a vacinação, respectivamente. A partir dos 210 dias após a vacinação somente um animal continuou positivo no AAT e esse mesmo animal permaneceu positivo até os 360 dias após a vacinação. Em nenhuma amostra de sangue realizada a PCR foi amplificado o produto dos oligonucleotídeos. Utilizando o sangue como amostra e nas condições deste trabalho, a PCR não se mostrou como uma técnica que permite avaliar a persistência da cepa vacinal em bezerras vacinadas. Os resultados do AAT demonstraram que o teste permite avaliar a persistência da amostra vacinal B19 em bezerras vacinadas.

Palavras-chave: Brucelose, diagnóstico, *Brucella abortus*, vacina.

Abstract

UMEDA, L. M .L. Evaluation of the persistence of the S19 vaccine with Rose Bengal test and PCR in vaccinated calves. Ano. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The *Brucella* sp. is the etiological agent that causes brucellosis, a zoonosis with global distribution. Brucellosis is considered one of the main abortion cause, low reproductive rates, calving interval increase, low milk production and calves death. This study verified the persistence of S19 vaccine by the serologic Rose Bengal Test (RBT) and molecular PCR methods in female calves aged six to eight months old. Forty eight female calves from six to eight months old non-vaccinated previously against brucellosis were accompanied by samples collected every 30 days, before and after vaccination with S19 samples in order to determine the persistence of this vaccine on these animals. The primers used in the PCR reaction were B4 and B5. All animals were negative at RBT before vaccination. Five animals showed negative results at RBT throughout the sample period of the experiment. The percentage of positive animals at RBT throughout the experiment was 80,65%, 66,6%, 20,83%, 10,42%, 6,25% to 30, 90, 120, 150 e 180 days after vaccination, respectively. From the 210th day after vaccination, only one animal was positive to the test and this animal remained positive until 360 days after vaccination. In any blood sample was carried out PCR amplified product of B4 and B5. Using blood as sample and under these conditions, PCR is a technique that doesn't allow the evaluation of the persistence of a vaccine strain S19 on vaccinated calves. The results of RBT showed that this test allow evaluate the persistence of vaccine strain S19.

Key words: Brucellosis, diagnostic, *Brucella abortus*, vaccine.

Lista de abreviaturas e siglas

μL	Microlitro
2-ME	2-Mercaptoetanol
AAT	Antígeno Acidificado Tamponado
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Força g
Kda	Kilidaltos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
ng	Nanograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pMol	Picomols
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal
UI	Unidades internacionais
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. Etiologia da brucelose.....	13
2. Fisiopatogenia.....	13
3. Sinais Clínicos.....	15
4. Vacinas.....	15
5. Resposta Imune do hospedeiro.....	17
6. Diagnóstico.....	18
6.1. Métodos indiretos.....	18
6.2. Métodos diretos.....	19
7. Epidemiologia	21
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINADO PELA PESQUISA	29

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Brucella* são o agente etiológico causador da brucelose, uma zoonose de distribuição mundial. É uma bactéria cocobacilo, intracelular facultativa e Gram-negativa, que causa problemas sanitários e grandes prejuízos econômicos (CUTLER et al., 2005; BRASIL, 2006).

O primeiro isolamento da bactéria foi feito em 1887, pelo médico David Bruce, em necropsias de soldados que morreram vítimas da enfermidade na costa do Mediterrâneo. Esse primeiro isolamento foi feito a partir do baço e a doença foi chamada de Febre de Malta, e o agente etiológico, *Micrococcus melitensis* e, posteriormente de *B. melitensis*. Em humanos a doença também é conhecida como Febre Ondulante, Febre de Malta ou Febre de Gibraltar. Nos animais é chamada de Doença de Bang, Aborto Contagioso, Aborto Infecioso ou Aborto Enzoótico (ACHA, SZYFRES, 2001; GOMES, 2013).

Em animais, *Brucella* spp. foi isolada em 1897, pelo veterinário Bernard Bang, a partir de um feto abortado bovino e mais tarde denominada como *B. abortus*. A brucelose é considerada como uma das principais causas de aborto e esterilidade nos animais domésticos, podendo o agente etiológico ser isolado em grandes quantidades da urina, descargas vaginais, sêmen e leite (SONGER, POST, 2005; GOMES, 2013).

Bactérias do gênero *Brucella* spp. são consideradas como agentes de bioterrorismo agrícola, civil e militar, uma vez que a mesma é uma ameaça à oferta de alimentos e causa a febre ondulante em humanos, doença debilitante e de longa duração (HALLING et al., 2005). É uma importante doença em humanos em várias partes do mundo, com exceção do Japão, Austrália, Canadá e vários países da Europa, onde foi erradicada (MONTEIRO, 2004). A duração da doença e o longo período de convalescência torna a brucelose humana importante economicamente, assim como um problema médico para o paciente que fica afastado de suas atividades rotineiras (CORBEL, 2006).

O rebanho bovino no Brasil é de 212 milhões de cabeças, com abate de 40,4 milhões ao ano (ABIEC, 2013). As perdas econômicas por conta da brucelose estão relacionadas aos abortos, baixos índices reprodutivos, aumento no intervalo entre partos, diminuição na produção de leite e morte de bezerras (BRASIL, 2006), além de gerar barreiras internacionais ao comércio de produtos de origem animal e perdas na indústria com a condenação da carne e leite e desvalorização desses produtos (JARDIM et al., 2006). A estimativa do prejuízo causado pela brucelose na América Latina foi de US\$ 600 milhões (ACHA; SZYFRES, 2001). Um trabalho realizado por Santos et al. (2013), demonstrou que o prejuízo total da

brucelose no Brasil foi estimado em R\$ 892 milhões de reais, e as perdas por fêmea infectada com idade superior a 24 meses, foi estimada em R\$ 420,12 e R\$ 226,47 em rebanhos de corte e leite, respectivamente.

Reconhecendo a brucelose como um importante problema de saúde animal e saúde pública, em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), definindo estratégias para o controle da doença no país. Este programa tem o intuito de reduzir a prevalência e a incidência de novos focos dessas doenças e criar um número significativo de propriedades certificadas como livres ou monitoradas para a brucelose e tuberculose, e desta forma reduzir o impacto destas zoonoses na saúde animal e humana além de aumentar a competitividade da pecuária nacional (BRASIL, 2006).

De acordo com o PNCEBT, a vacinação dos animais é uma das formas de prevenção. A vacina B19 é a oficialmente aprovada pelo PNCEBT, que torna obrigatória a vacinação de fêmeas entre três a oito meses de idade. Não é recomendada a vacinação de machos e fêmeas gestantes, pois pode levar a um quadro de orquite e aborto, respectivamente (BRASIL, 2006). Existem na literatura trabalhos que relatam a excreção da cepa vacinal B19, onde foi possível a detecção da mesma por meio da PCR em amostras de queijo (MYASHIRO et al., 2007) e em leite e urina, em animais com nove anos de idade (PACHECO et al., 2012).

Na ausência de vacinas para brucelose em humanos, a prevenção da doença ocorre por meio do controle da enfermidade nos animais. A facilidade de transmissão de algumas espécies de *Brucella* spp. aos animais e ao homem mostra a importância do controle desta doença (GOMES, 2013).

O diagnóstico da brucelose bovina pode ser feito por meio de métodos diretos, pela identificação do agente ou pela detecção do DNA da bactéria e pelos métodos indiretos, que detectam anticorpos contra *B. abortus*. O teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) é um teste de triagem eleito pelo PNCEBT pelo fato de ter uma alta sensibilidade, fácil execução e baixo custo. A associação de um método sorológico com um método confirmatório é essencial para o diagnóstico da doença (BRASIL, 2006).

O isolamento bacteriano é um teste confiável e geralmente definitivo, feito a partir de tecidos do hospedeiro, sendo considerado teste padrão-ouro. Entretanto possui como desvantagem o tempo necessário para o isolamento e o risco para os profissionais que trabalham no laboratório (GODFROID et al., 2010).

A tipificação da *Brucella* spp. fornece informações epidemiológicas valiosas para rastrear a infecção até a sua fonte, casos em que várias espécies do gênero *Brucella* spp. estão

circulantes (GODFROID et al., 2010). A detecção rápida de microrganismos de crescimento lento, ou até mesmo não cultiváveis, é possível por meio de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (MOLINA; TOBO, 2004).

A PCR é um método molecular que permite a identificação de *Brucella* spp. em sangue, leite, urina, sêmen, tecido linfóide e material de aborto ou secreções de bovinos após o parto, sendo um método com alta sensibilidade e especificidade, e a escolha da sequência alvo e a definição dos oligonucleotídeos iniciadores dentro das sequências de DNA são de grande importância na obtenção de bons resultados (MOSQUERA et al., 2008; ELISEI et al., 2010). Amostras de sangue são frequentemente utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina pela PCR (YU; NIELSEN, 2010).

O isolamento de *Brucella* sp. ou detecção do DNA bacteriano pela PCR são os únicos métodos, segundo Godfroid et al. (2010), que permitem a certeza do diagnóstico, desde que usado um oligonucleotídeo iniciador adequado. Para superar as desvantagens do isolamento, a amplificação de ácidos nucleicos tem sido explorada para a rápida confirmação e detecção de *Brucella* spp. (PROBERT et al., 2004).

O uso da PCR como diagnóstico para a brucelose tem sido bastante estudado na literatura devido as suas vantagens, quando comparada aos métodos sorológicos confirmatórios ou a cultura bacteriana. A possibilidade de obtenção rápida dos resultados e também a caracterização da cepa causadora da doença são outras vantagens importantes desse método molecular, visto a importância de ações a serem tomadas nos casos da doença.

A excreção da cepa vacinal B19 tem sido relatada por diversos trabalhos na literatura (Nicoletti, 1991; Myashiro et al., 2007; Pacheco, 2012) e sua identificação é feita principalmente a partir da urina e leite, por meio da PCR e cultivo microbiológico. A presença da cepa vacinal em amostras de leite e urina é uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a mesma pode causar a doença em humanos. Essa eliminação da B19 também é um importante fator na infecção de animais no rebanho, uma vez que a mesma pode infectar machos e fêmeas fora da faixa etária em que a vacinação é obrigatória.

Desta forma, objetivou-se avaliar a persistência por 12 meses da vacina B19 em fêmeas bovinas vacinadas com idade entre seis a oito meses de idade pelos métodos sorológico AAT e molecular PCR.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Etiologia da brucelose

Reino Monera

Filo Proteobacteria

Classe Alphaproteobacteria

Ordem Rhizobiales

Família Brucellaceae

Gênero *Brucella*

As bactérias do gênero *Brucella* são pequenos cocobacilos (0,6 x 0,6 a 1,5 μm), Gram-negativos, imóveis, intracelulares facultativas, aeróbias, não capsuladas, não flageladas e não esporuladas (QUINN et al., 2002, REDKAR et al., 2001). Em meios de culturas as colônias podem apresentar características lisa ou rugosa, o que está relacionado à composição do lipopolissacarídeo da parede celular e que também está relacionado a virulência em algumas espécies (BRASIL, 2006). Em meios primários, colônias de *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* apresentam característica lisa, pequenas, brilhantes, azuladas e translúcidas após incubação por três a cinco dias, tornando-se opacas com a idade. Já colônias primárias de *B. canis* e *B. ovis* são rugosas, opacas, amareladas e friáveis (QUINN et al., 2002). A temperatura ótima de crescimento é 37° C, pH ótimo de 6,6 a 7,4 (GOMES, 2013).

Atualmente, esse gênero possui dez espécies e são classificadas de acordo com seu hospedeiro e patogenicidade: *Brucella abortus* em bubalinos, cervídeos, canídeos e homem, *Brucella melitensis* em caprinos, bovinos, canídeos e homem, *Brucella suis* em suínos e bovinos, *Brucella canis* em canídeos e homem, *Brucella neotomae* em ratos do deserto, *Brucella ovis* em ovinos (SONGER; POST 2005), *Brucella ceti* em golfinhos e baleias e *Brucella pinnipedialis* em focas e leões marinhos (FOSTER et al., 2007), *Brucella microti* (SCHOLZ et al., 2008) em camundongos do campo e *Brucella inopinata* em humanos (SCHOLZ et al., 2010). As três principais espécies são divididas em biovars: *B. abortus* com sete biovars, *B. melitensis* com três biovars e *B. suis* com cinco biovars (ACHA, SZYFRES, 2001; BRASIL, 2006).

2. Fisiopatogenia

As bactérias do gênero *Brucella* têm preferência por órgãos do sistema reprodutor feminino e masculino. Os animais infectados permanecem como fonte de infecção para os demais animais do rebanho, e as bactérias podem permanecer viáveis, porém sem multiplicação, por vários meses no meio ambiente, embora a principal forma de transmissão seja o contato direto com animais infectados ou com fluidos ou tecidos de abortos. Outras formas de infecção incluem a transmissão venérea, penetração por ferimentos na pele ou inalação (QUINN et al., 2002, BRASIL 2006).

O período de incubação (que é o momento desde a infecção até a ocorrência dos sinais clínicos) é difícil de ser determinado em condições naturais, pois não se pode determinar o momento da infecção, porém em experimentos foi demonstrado que este período é muito variável e inversamente proporcional ao desenvolvimento da gestação, ou seja, quanto mais avançada a gestação menor é o período de incubação (ACHA; SZYFRES, 2001).

A principal via de entrada de *Brucella* spp. no organismo do animal ocorre pela mucosa digestiva, pelo hábito das vacas lambem membranas fetais, fetos e bezeros recém-nascidos e também pela ingestão de pastagens e água contaminada. Outras vias incluem a vaginal, nasal e soluções de continuidade da pele. Ao penetrar no animal, as bactérias são internalizadas pelas células M nas placas de Peyer, se multiplicam nos gânglios regionais, no interior dos macrófagos e depois migram para diferentes órgãos por meio da linfa e sangue. Em animais infectados, as localizações de maior frequência das bactérias são linfonodos, baço, fígado, aparelho reprodutor masculino, útero e úbere (ACHA; SZYFRE, 2001; XAVIER et al., 2009). A presença do microrganismo no útero gravídico leva a uma inflamação das membranas, pela multiplicação bacteriana nos cotilédones, interferindo na circulação do feto e levando a ocorrência do aborto, por falta de aporte nutricional, anoxia e endotoxemia fetal e placentite necrótica (SONGER, POST, 2005; GOMES, 2013).

A susceptibilidade dos tecidos fetais é explicada pela grande quantidade de eritritol presente na placenta, líquidos fetais e placentomas que estimula a multiplicação da bactéria. O eritritol também está presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e reprodutores feminino e masculino (KEPPIE et al., 1964; ACHA; SZYFRES, 2001).

Nos machos, as bactérias podem localizar-se nos testículos e glândulas genitais anexas. Quando ocorre a manifestação clínica da doença, pode ocorrer orquite em um ou ambos testículos, diminuição da libido e infertilidade. Aderências e fibroses podem levar a

uma atrofia do testículo. É frequente o aparecimento de inflamação da vesícula seminal e das ampolas e ocasionalmente podem ocorrer higromas e artrites (ACHA; SZYFRES, 2001).

3. Sinais Clínicos e sintomas

A brucelose é uma doença que essencialmente afeta os animais domésticos e os humanos são considerados hospedeiros acidentais. No homem, é caracterizada por febre aguda e há evolução da doença para a forma crônica. Inicialmente ocorre o aparecimento de febre ondulante, acompanhada de mal estar, anorexia, prostração, dores de cabeça e dores articulares (CORBEL et al., 2006). Após o período de incubação, que varia de 2-3 semanas, há o aparecimento de febre (acima de 38°C), sudorese intensa, predominantemente noturna e dor (PESSEGUEIRO, 2003).

Já nos animais domésticos, placentite seguida de aborto, principalmente no terço final da gestação, nascimentos de prematuros, epididimite e orquite (CORBEL et al., 2006).

4. Vacinas

A vacina B19 é a mais utilizada, e foi produzida a partir de uma cepa esquecida em temperatura ambiente e sofreu atenuação e desde 1930 tem sido utilizada para a imunização de bezerras entre três a oito meses de idade. É uma cepa de baixa patogenicidade e alta imunogenicidade para bovinos. O animal vacinado não dissemina a cepa vacinal para outro animal. A resistência que a vacina gera dura por muitos anos. Ela protege contra infecção e abortamento em cerca de 60 a 75% de acordo com a prevalência da doença no rebanho (ALTON, 1988; WHO, 1997).

Esta vacina possui como características negativas causar orquite e aborto, quando utilizadas em fêmeas gestantes. Por se tratar de uma vacina viva, pode causar a doença no homem. Outra importante desvantagem da vacina B19 é que por ser uma cepa lisa, induz a produção de anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS), interferindo no diagnóstico sorológico, porém se esses animais forem vacinados na idade recomendada esses anticorpos desaparecem rapidamente e os mesmos são negativos nas provas sorológicas, desta forma não é recomendada a vacinação de animais adultos (ALTON, 1988; WHO, 1975; PAULIN, 2006).

A cepa B19 possui uma deleção no gene *ery* de 702 pb, responsável pelo catabolismo do eritritol, tornando essa cepa sensível a esse álcool (SANGARI et al., 1994; SANGARI et

al., 2000). Esse gene tem sido um importante marcador na diferenciação da cepa B19 das cepas selvagens (SANGARI et al., 1994; EWALT; BRICKER, 2000).

A vacinação deverá ser realizada sob responsabilidade de médicos veterinários obrigatoriamente cadastrados no serviço veterinário oficial do estado de atuação. A B19 foi utilizada em vários países que erradicaram a doença como o Canadá, Austrália, Dinamarca, Suécia, Inglaterra, Holanda e outros. Também foi utilizada nos EUA até a primeira metade da década de 1990, no programa de controle da doença no país (BRASIL, 2006).

Em alguns casos, animais vacinados com a B19 podem tornar-se persistentemente infectados (ALTON, 1988). A eliminação da cepa vacinal B19 no leite foi estudada por Nicoletti (1991), onde em animais vacinados com a dose padrão, 0,83% eliminou a cepa vacinal e 0,45% dos animais que receberam a dose reduzida da vacina eliminou a mesma.

A RB51 é uma cepa mutante atenuada da cepa selvagem S2308, obtida por meio de passagens repetidas em meios com rifampicina e seleção de colônias de morfologia rugosa. A principal vantagem dessa cepa é que ela não possui a cadeia O do LPS de membrana, e assim, não induz a produção de anticorpos que interferem nos testes diagnósticos (OLSEN et al., 1999).

Segundo Olsen et al. (1999), os critérios de biossegurança para uma vacina viva contra brucelose são: após a vacinação, não são detectados sinais clínicos da doença, a bactéria deve persistir nos linfonodos durante mais de seis e menos de 12 semanas, a bacteremia se manter por menos de três dias, a bactéria não deve ser detectada em secreções nasais, saliva e urina, os anticorpos séricos aparecem 14 dias após a imunização, a imunossupressão não levar ao aparecimento da doença, não ser observada depleção linfóide nos linfonodos de drenagem do ponto de inoculação, não serem observadas alterações inflamatórias ou degenerativas nos tecidos e na recuperação bacteriana do hospedeiro, após 12 dias as bactérias serem geneticamente idênticas a cepa vacinal.

Foi detectado o mesmo nível de proteção entre a RB51 e a B19 em estudo realizado por Olsen et al. (1999). Nesse estudo foram vacinadas 71 bezerras entre três e 10 meses de idade com a cepa RB51 e 19 bezerras com as mesmas idades com a cepa B19. A porcentagem de proteção foi de 97% e 100% para a RB51 e B19, respectivamente, não havendo diferenças estatísticas entre os valores.

5. Resposta imune do hospedeiro

A imunidade protetora contra infecções por *Brucella* spp. é principalmente estudada em linhagens de camundongos BALB/c e CD-1. Nesses animais, foi demonstrada imunidade protetora contra esta enfermidade por meio de experimentos com imunização ativa e passiva, que são mediadas por anticorpos e também por resposta imune mediada por células. O critério utilizado na avaliação dessa imunidade protetora é a redução em determinado período, após o desafio com uma cepa virulenta, do número de unidades formadoras de colônias (UFC) do baço, fígado ou ambos (WHO, 1997).

A resposta imune do hospedeiro envolve a resposta imune inata e a adquirida. A especificidade da resposta imune natural, na qual atua de maneira destacada o sistema mononuclear fagocítico (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas), é única frente aos produtos dos microrganismos, diferente da resposta imune adquirida que é composta pela ação de linfócitos T, na produção de citocinas e ação citotóxica e linfócitos B na produção de anticorpos, chamada de imunidade humoral (ARÉSTEGUI et al., 2001; PARKIN; COHEN, 2001; ABBAS et al., 2008). A resposta imune inata tem um papel importante durante a infecção por *B. abortus*, uma vez que ela reduz o número inicial de bactérias e pode influenciar no desenvolvimento da imunidade adquirida (CARVALHO NETA et al., 2010).

O sistema imune inato reconhece substâncias dos patógenos conhecidas como padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs), por meio de receptores chamados de Receptores de Reconhecimento Padrão (ABBAS et al., 2008). Uma vez que a bactéria não opsonizada é fagocitada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), ela sobrevive no interior do fagossomo acidificado e inibi a fusão do mesmo com o lisossomo que possui enzimas, oxigênio reativo e intermediários de nitrogênio, com funções microbicidas. Essa inibição da fusão fagossomo-lisossomo é o principal mecanismo de sobrevivência intracelular das bactérias do gênero *Brucella* spp. (QUINN et al., 2002). A ligação dos PAMP's com os Receptores de Reconhecimento Padrão inicia a sinalização que estimula a defesa do organismo do hospedeiro pela indução da produção de intermediários de oxigênio e nitrogênio e pela ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) pela indução de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas co-estimulatórias, desencadeando a resposta imune celular (WERLING; JUNGI, 2003).

A fagocitose das bactérias ativam as APCs que processam esse material em peptídeos e os apresentam em associação com as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II e I aos linfócitos T CD4 e T CD8, respectivamente

(SKENDROS; BOURA, 2013). Os linfócitos T são os principais responsáveis na resistência a bactérias intracelulares e determinam a resolução da infecção (WHO, 1997).

A resposta imune humoral se dá pela produção de anticorpos específicos contra a cadeia O do LPS, pelos linfócitos B (BRASIL, 2006; SKENDROS; BOURA, 2013). O LPS é o principal antígeno de superfície de *Brucella* spp. de cepas lisas. A principal diferença na estrutura da parede celular entre as cepas lisas e rugosas é que a última não possui a cadeia O do LPS (GOMES, 2013).

Os anticorpos produzidos tem ação neutralizante e também atuam como opsoninas, ativando a imunidade celular, pois facilita a fagocitose pelas APCs, ativam complemento e promovem a citotoxicidade celular anticorpo-dependente (BALDWIN; GOENKA, 2006). O isotipo IgM é o primeiro a ser produzido, a partir da primeira semana pós infecção ou vacinação. Logo após ocorre o aparecimento da IgG1, seguido de IgG2 e IgA (BRASIL, 2006). A máxima produção de anticorpos da classe IgG ocorre após 28 a 42 dias da infecção ou vacinação (Navarro, 1995). Em bezerras vacinadas até os oito meses de idade, ocorre um rápido decréscimo nos níveis de anticorpos, não sendo mais detectados nas provas sorológicas. (BRASIL, 2006).

6. Diagnóstico

Os sinais clínicos da doença não são patognomônicos, assim o histórico do rebanho é de grande importância. O diagnóstico da brucelose geralmente é realizado por métodos sorológicos ou bacteriológicos. Os métodos indiretos são baseados na detecção de anticorpos contra *B. abortus* e os métodos diretos na identificação do agente.

6.1. Métodos Indiretos

Os métodos indiretos detectam a presença de anticorpos contra o agente e podem ser utilizados diferentes fluidos corporais como: o soro, leite, muco vaginal e sêmen e resultados positivos indicam exposição do animal ao agente ou outros organismos intimamente relacionados. O ideal é que esse teste consiga detectar a doença nos estágios iniciais e que diferencie anticorpos vacinais de infecção. Reações falso-positivas podem ocorrer pelos anticorpos não específicos, isso devido a infecções por outras bactérias ou interferência de anticorpos vacinais relacionados à vacina B19. Os títulos de anticorpos podem persistir por um longo período em uma pequena porcentagem dos animais vacinados e essa porcentagem

umenta com a idade em que esses animais foram vacinados. Os testes sorológicos são muito utilizados, pois nem sempre a identificação do agente por métodos bacteriológicos é possível (ALTON, 1988; BRASIL, 2006; CORBEL et al., 2006).

O teste de soro aglutinação com AAT é um teste de triagem, por ser de fácil execução e de baixo custo. Neste teste, reações positivas podem ocorrer em animais vacinados com B19, desta forma, é recomendada a realização de outros testes com uma maior especificidade que o AAT. Este teste qualitativo, demonstra somente a presença de anticorpos da classe IgG1 e não a sua titulação. Anticorpos dessa classe são produzidos nas fases iniciais de infecção, e desta forma o AAT detecta infecções recentes (BRASIL, 2006; OIE, 2009).

O teste do anel em leite é realizado em mistura de leite de vários animais e é utilizado para detecção de brucelose no rebanho. As reações positivas são caracterizadas pela formação de um anel azul na camada de creme do leite, devido à presença do corante hematoxilina. Se houver a presença de anticorpos contra *Brucella* spp., eles se ligarão ao antígeno corado com hematoxilina e serão carregados pelos glóbulos de gordura para a camada de creme. Leites muito ácidos ou provenientes de vacas com mastite e colostro são consideradas causas de reações falso-positivas nesse teste (ALTON, 1988; BRASIL, 2006; OIE, 2009).

O teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) é um teste confirmatório, quantitativo e seletivo, pois detecta somente IgG que é indicativo de infecção crônica. Este teste deve ser realizado sempre em paralelo à prova lenta em tubos (BRASIL, 2006).

O teste de soroaglutinação em tubos é um teste confirmatório utilizado junto com o 2-ME e sua leitura deve ser realizada em 48 horas. É prova padronizada frente a um soro internacional e o resultado expresso em unidades internacionais (BRASIL, 2006).

O teste de fixação de complemento é o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OIE) para o trânsito internacional de animais. O princípio deste teste é baseado na habilidade de alguns isotipos de anticorpos em ativar o complemento do soro de cobaia, formando imunocomplexos com antígeno (células de *B. abortus* mortas). Esse teste detecta tanto IgG1 quanto IgM (BRASIL, 2006). É método com alta especificidade, porém é um teste complexo que exige pessoal treinado (ALTON, 1988; BRASIL, 2006). Reações positivas podem ocorrer neste teste devido à vacinação com a B19 ou reações inespecíficas. Entretanto fêmeas vacinadas com idade entre três a seis meses são consideradas positivas se apresentarem reação positiva ao teste de fixação de complemento de 30 ou mais unidades de fixação de complemento/mL quando testadas a partir de 18 meses de idade (OIE, 2009).

O teste de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) possui excelente sensibilidade e especificidade, é de fácil execução e possui uma grande variedade de kits comerciais além de necessitar de um mínimo de equipamentos para sua realização (CORBEL et al., 2006).

O teste de fluorescência polarizada é uma técnica simples que permite medir a interação entre antígeno e anticorpo e pode ser realizado tanto em laboratório como no campo. O mecanismo do teste baseia-se na rotação aleatória de moléculas em solução. O tamanho da molécula é o principal fator que influencia na taxa de rotação e é inversamente proporcional, ou seja, moléculas pequenas tem uma maior rotação do que moléculas maiores. O antígeno utilizado é preparado com a cadeia O do LPS de *B. abortus* marcado com isotiocianato de fluoresceína e determina-se por meio de equipamento com luz polarizada a velocidade de rotação das moléculas (OIE, 2009).

6.2. Métodos Diretos

A PCR é um método de amplificação de ácidos nucléicos rápido, de alta sensibilidade e especificidade, que se tornou a base para numerosas técnicas moleculares, inclusive em laboratórios de diagnósticos clínicos. Neste método, ocorre a amplificação de cópias de sequências específicas de ácidos nucléicos, para no final obter uma quantidade de produto amplificado que possa ser analisado (COLEMAN; TSONGALIS, 2006).

A técnica permite a identificação de *Brucella* spp. em sangue, leite, urina, sêmen, tecido linfóide e material de aborto ou secreções de bovinos após o parto, sendo um método com alta sensibilidade e especificidade, onde a escolha da sequência alvo e a definição dos oligonucleotídeos iniciadores dentro das sequências de DNA são de grande importância na obtenção de bons resultados (O' LEARY et al., 2006; MOSQUERA et al., 2008; ELISEI et al., 2010). Amostras de sangue são frequentemente utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina pela PCR (YU; NIELSEN 2010).

O isolamento de *Brucella* spp. ou detecção do DNA bacteriano pela PCR é o único método, segundo Godfroid et al. (2010), que permite a certeza do diagnóstico, desde que usado um oligonucleotídeo iniciador adequado. Para superar as desvantagens do isolamento, a amplificação de ácidos nucléicos tem sido explorada para a rápida confirmação e detecção de *Brucella* spp. (PROBERT et al., 2004).

Sharifi et al. (2008) citam como vantagem da PCR, em relação ao método microbiológico utilizados para a identificação de espécies, a velocidade que a PCR é realizada

e também pela possibilidade da bactéria poder estar morta, o que é muito importante em relação a patogenicidade para humanos, uma vez que o risco de manipulação de culturas vivas de *Brucella* sp. é muito grande.

Vários genes alvos são utilizados para a identificação da *Brucella* spp., como: genes que codificam para proteínas externas de membrana (*omp 2b*, *omp2a* e *omp31*) (IMAOKA et al., 2007), sequência de gene *16SrRNA* (HERMAN; RIDDER, 1992), região inter-gênica *16S-23S* e genes funcionais (RIJPENS et al., 1996), gene *ery* ligado a síntese do eritritol (BRICKER; HALLING, 1994) e *bcs31* (BAILY et al., 1992). Um marcador importante, usado na diferenciação da B19 das cepas selvagens é o gene ligado ao catabolismo do eritritol (EWALT; BRICKER, 2000).

Em estudo realizado com PCR que utilizou os genes *bcs31*, *omp2* e o *16SrRNA* como alvos encontrou baixa sensibilidade para o *16SrRNA* para sangue bovino, pois não detectou como *Brucella* spp. em 14 de 19 cepas de isolados, das quais, sete eram amostras de leite de bovinos, identificando apenas duas como positivas. O *bcs31* apresentou sensibilidade similar a combinação do gene *omp2* e ELISA. O uso de mais de um gene marcador para PCR melhorou a sensibilidade e aumentou a especificidade, indicando ser um diagnóstico molecular mais confiável para triagem de animais a campo (MUKHERJEE, 2007).

Uma PCR combinada foi usada para detecção de *Brucella* spp. ao nível de gênero. Foram utilizados quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores derivados do gene *bcs31* e proteínas da membrana externa (*omp2b*, *omp2a* e *omp31*) em quatro PCRs individuais em diferentes combinações para a identificação de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. canis* e *B. suis*. Essas PCRs demonstraram ser métodos ideais para a detecção da brucelose humana (IMAOKA et al., 2007).

A tipificação da *Brucella* spp. é crítica no controle e erradicação da mesma. Os métodos convencionais de identificação de cepas e biovars levam no mínimo cinco dias, enquanto ensaios moleculares possuem alta sensibilidade e especificidade e um tempo menor para a diferenciação entre espécies e biovars (SHARIFI et al., 2008).

Em um estudo que avaliou o uso da PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores B4 e B5 na detecção de *B. abortus* em amostras de sangue e leite bovinos, encontrou em 33 amostras de leite negativas no teste do Anel em Leite, 30,3% positivas na PCR. Em 94,1% das amostras positivas no teste do anel em leite foram positivas na PCR e 5,8% foram negativas na PCR. A positividade no teste de anel em leite pode ser decorrente de reações cruzadas com outras bactérias (MOSQUERA et al., 2008).

Em estudo utilizando PCR no diagnóstico da brucelose em cervídeos do Pantanal Sul Mato-Grossense, foi utilizado com alvo o gene *virB5* de *B. abortus*. Foram analisadas 44 amostras de sangue, das quais nove foram positivas na PCR, representando 20,4% de positividade (ELISEI et al., 2010).

7. Epidemiologia

A brucelose é uma doença de distribuição mundial. É considerada endêmica nos países do Mediterrâneo, África, Índia, Ásia central e Américas do Sul e Central (SONGER; POST 2005). As estratégias de combate para a brucelose são baseadas na vacinação, certificação de propriedades livres por testes indiretos, controle da movimentação de animais e sistema de vigilância específico. Os resultados obtidos com essas estratégias são variados, havendo registros de sucesso e fracasso (POESTER et al., 2009).

A espécie *B. abortus* biovar 1 é o principal patógeno e é universalmente predominante dos sete biovars e está presente em todo o mundo (ACHA; SZYFRES, 2001). Em vários países, a doença é alvo de programas de controle desde o século XX. Quando os programas são bem estruturados, a diminuição da frequência da doença diminui depois de aproximadamente 20 anos (FERREIRA NETO, 2009). A maioria dos países do Norte da Europa e a Noruega foram declaradas oficialmente livres de brucelose bovina (GODFROID; KÄSBOHRER, 2002).

O MAPA, em 1975, realizou um estudo epidemiológico da brucelose bovina no Brasil. Neste estudo, na região Sul, a porcentagem de animais soropositivos foi de 4%, no Sudeste foi de 7,5%, 6,8% no Centro-Oeste, 2,5% no Nordeste, e 4,1% na região Norte (BRASIL, 2006). Entre os anos de 1988 e 1998, a prevalência de animais soropositivos ficou entre 4 e 5%, de acordo com os boletins de Defesa Sanitária Animal (FERREIRA NETO, 2009).

No Mato Grosso do Sul, a prevalência da doença nos rebanhos varia de 37,3% (Monteiro et al., 2006) a 41,5% (CHATE et al., 2009). Monteiro et al. (2006), estimaram a prevalência da brucelose em 22 municípios de Mato Grosso do Sul, por meio do teste de triagem (AAT) e pelo teste confirmatório do 2-Mercaptoetanol (2-ME) e encontraram 5,6% animais positivos.

No estado do Maranhão a prevalência encontrada para propriedades positivas foi de 11,42% e de animais positivo foi de 2,52% segundo Borba (2012). Em Rondônia, a prevalência encontrada foi de 35,2% de rebanhos positivos e de animais positivos de 6,2% (VILLAR et al., 2009). Já no estado da Bahia, a prevalência de focos foi de 4,2% e fêmeas

adultas soropositivas foi de 0,66% (ALVES et al. 2009). No estado de São Paulo, a prevalência estimada de rebanhos positivos foi de 9,7% e de animais soropositivos de 3,8% (DIAS et al. 2009).

A prevalência da doença em humanos está relacionada com a densidade populacional de bovinos, caprinos e ovinos, ao nível de endemia animal, hábitos alimentares e nível socioeconômico (PESSEGUEIRO et al., 2003).

A principal forma de introdução da doença em um rebanho é pela introdução de animais infectados, e desta forma quanto maior a frequência de introdução de animais no rebanho, maior a chance de ocorrer a doença. Uma forma de minimizar esse risco é introduzir somente animais provenientes de propriedades livres de brucelose (BRASIL, 2006). A eliminação dos animais positivos no rebanho é uma das formas de controle da doença, além da vacinação sistemática dos animais (ALTON, 1988).

No ambiente a bactéria somente sobrevive, e não há multiplicação. A pasteurização entre 10 e 15 segundos inativa as bactérias e desinfetantes comuns como cresol 3%, hidróxido de sódio a 2%, compostos de ortofenóis a 3-5%, mercuriais e álcool 70% destroem rapidamente as mesmas (GOMES, 2013).

A excreção da cepa B19 tem sido relatada por diversos trabalhos na literatura (Nicoletti, 1991; Myashiro et al., 2007; Pacheco, 2012), e sua identificação é feita principalmente a partir da urina e leite, por meio da PCR e cultivo microbiológico, porém existem poucos trabalhos que visaram determinar a persistência da vacina B19 por meio da PCR e métodos sorológicos. A presença da cepa vacinal em amostras de leite e urina é uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a mesma pode causar a doença em humanos. Essa eliminação da B19 também é um importante fator na infecção de animais no rebanho, uma vez que a mesma pode infectar machos e fêmeas fora da faixa etária em que a vacinação é obrigatória.

Desta forma, objetivou-se avaliar a persistência da vacina B19 pelo método sorológico AAT e molecular PCR em fêmeas bovinas vacinadas com idade entre seis a oito meses de idade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008
- ABIEC. **Estatísticas - Balanço da pecuária**. ABIEC. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/texto.asp?id=8>> Acesso em: 03 jan. 2014.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001.
- ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris : Institut National de la Recherche Agronomique, 1988.
- ALVES, A.J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; BAHIANSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; DIAS, R.A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, p.6-13, 2009.
- ARÉSTEGUI, M. B.; GUALTIERI C. S.; DOMÍNGUEZ, J.; SCHAROVSKY, G. O. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. **Vet. Méx.**, México, v. 32, n. 2. 2001. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2001/vm012f.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2013.
- BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.S. & STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.
- BALDWIN, C.L.; GOENKA, R. Host Immune Responses to the Intracellular Bacteria *Brucella*: Does the Bacteria Instruct the Host to Facilitate Chronic Infection?. **Immunology**, v. 26, n. 5, p.407–442, 2006.
- BORBA, M.R. **Caracterização epidemiológica da brucelose bovina no estado do Maranhão**. 2012. 82f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico**. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 184p.
- BRICKER, B. J. & HALLING S. M. Differentiation of *Brucella abortus* (bv. 1, 2, and 4), *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* (biovar 1) by the Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 11, p. 2660-2666, 1994.

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

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, p.46-55, 2009.

COLEMAN W. B.; TSONGALIS G. J. **Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian.** 2nd ed. Humana Press: Totowa, N. J.; 2006.

CORBEL, M. J.; ELBERG S. S.; COSIVI, O. **Brucellosis in humans and animals.** Geneva: WHO Press, 2006. 102 p.

CUTLER S. J.; WHATMORE A. M. & COMMANDER N. J. Brucellosis – new aspects of an old disease. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 1270-1281, 2005.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S.; GUNNEWIEK, M.F.K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J.S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, p.118-125, 2009.

ELISEI, C; PELLEGRIN, A; TOMAS, W. M; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F. R; FUNES-HUACCA, M. & ROSINHA, G. M. S. Evidência molecular de *Brucella* sp. em *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro) do Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 6, p.503-509, 2010.

EWALT, D. R. & BRICKER, B. J. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 8, p. 3085-3086, 2000.

FERREIRA NETO, J. S. **Situação epidemiológica da brucelose bovina no Brasil: bases para as intervenções.** Ciência Animal Brasileira. 2009 Disponíveis em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7669>> Acessado em: 16 abr. 2013.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B. S.; GODFROID, J. J. 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.**, v. 57, p. 2688-2693, 2007.

GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. **Vet. Microbiol.**, v. 90, p.135-145, 2002.

GODFROID, J.; NIELSEN, K. & SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croat. Med. J.**, v. 51, p.296-305, 2010.

GOMES, M. J. P. Gênero *Brucella* spp. **Microbiologia Clínica Veterinária**. Área de bacteriologia – UFRGS, 2013.

HERMAN, L. & DE RIDDER, H. Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 2099-2101, 1992.

HALLING, S. M.; PETERSON-BURCH, B. D.; BRICKER, B. J.; ZUERNER, R. L.; QING, Z.; LI, L. L.; KAPUR, V.; ALT, D. P.; OLSEN, S. C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 8, p. 2715-2726, 2005.

IMAOKA K.; KIMURA, M.; SUZUKI, M.; KAMIYAMA, T. & YAMADA, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, p. 137-139, 2007.

JARDIM, G. C.; PIRES, P. P. MATHIAS, L. A., RIBEIRO, O. C., KUCHEMUCK, M. 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, 2006.

KEPPIE, J.; WILLIAMS, A. E.; WITT, K.; SMITH, H. The role of erythritol in the tissue localization of the *brucellae*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.46, n. 1, p. 104-108, 1964.

MOLINA, A. L.; TOBO P. R. Série - Biologia Molecular Atualização Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Editora Associada da Einstein**. v. 2, n. 2, p. 139-142, 2004. Disponível em: <<http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2013.

MONTEIRO, L. A. R. C. **Prevalência e fatores de risco associados à brucelose bovina em rebanhos de Mato Grosso do Sul**. 2004. 64f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2004.

MONTEIRO, L. A. R. C.; PELLEGRIN A. O.; ISHIKAWA M. M.; OSÓRIO A. L. A. R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2006.

MOSQUERA, C. X; BERNAL, C. & MUSKUS, C. Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. **Rev. MVZ Córdoba**, v. 13, n. 3, p. 1504-1513, 2008.

MUKHERJEE, F.; JAIN, J.; PATEL, V. & NAIR, M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 1309-16, 2007.

MYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CAMPOS, F. R.; VIALTA, A.; KEID L. B.; DIAS R. A., GENOVEZ, M. E. Detection of *Brucella abortus* Dna in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 17-22, 2007.

NICOLETTI, P. 1991. Vaccination - Bovine Brucellosis. **Networking in brucellosis research Workshop**, Networking in brucellosis research; 85-92

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Bovine Brucellosis. **Terrestrial Animal Health Code**. 2009.

O' LEARY, S.; SHEAHAN, M. & SWEENEY, T. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, p. 170-176, 2006.

OLSEN, S. C.; CHEVILLE, N. F.; BRICKER, B. et al. **Informe técnico sobre la vacunación del ganado con la cepa RB51 de *Brucella abortus***. 1999. Disponível em: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/18-informe_vacunacion_brucela_cepa_rb51.pdf. Acesso em 01 Abr. 08.

PACHECO, W. A.; GENOVEZ, M. E.; POZZI, C. R. et al. Excretion of *Brucella abortus* vaccine S19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 594-601, 2012.

PARKIN, J. & COHEN, B. An overview of the immune system. **Immunology**, v.357, p. 1777-1789, 2001.

PAULIN, L. M. S. **Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. São Paulo, 2006. 92p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Med. Interna**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.61, p.1-5, 2009.

PROBERT, W.S.; SCHRADER, K. N.; KHUONG, N. Y.; BYSTROM, S. L. & GRAVES, M. H. Real Time Multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.3, p. 1290-1293, 2004.

QUINN, B. K.; MAEKEY, F. C.; LEONARD, E. S. et al. *Brucella species*, In: **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. Chichester: Blackwell Science, 2002. p 448-459.

REDKAR, R.; ROSE, S.; BRICKER, B.; DELVECCHIO, V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 43-52, 2001.

RIJPENS, N. P.; JANNES, G.; VAN ASBROECK, M.; ROSSAUR & HERMAN L. M. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n.5, p. 1683-1688, 1996.

SANGARI, F. J.; GARCIA-LOBO, J. M; AGÜERO, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.121, p. 337-342, 1994.

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

SANTOS, R. L.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M., PAIXAO, T. A.. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n.6, p. 759-764, 2013.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE A. M.; FALSEN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, n.2, p. 375–382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J. & KUMAR De, B. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, n.4, p. 801-808, 2010.

SHARIFI, Y.; KHAZRAIINIA, P.; ZAHRAEI SALEHI, T. & BEHROOZIKHAH, A. M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella* in Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 9, n.1, p. 19-24, 2008.

SKENDROS, P. & BOURA, P. Immunity to brucellosis. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 32, n. 1, p. 137-147, 2013.

SONGER J. G. & POST K. W. **Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease**. 1 ed. Saint Louis: Saunders, 2005. p 299-309.

VILLAR, K.S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, p.85-92, 2009.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathology immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **J. Comp. Pathol.** London, v. 140, n. 2-3, p. 149-157, 2009.

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

WHO. World Health Organization. **Laboratory Techniques in Brucellosis**. 2^a edição. Geneva, 1975. 161 p.

WHO. World Health Organization. 1997. **The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting**. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.14.pdf. Acesso em: 24/05/2012.

YU, W. L. & NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. **Croat. Med. J.**, v. 51, n.4, p. 306-313, 2010.

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINADO PELA PESQUISA

Avaliação da Persistência da Vacina B19 pelo teste do AAT e PCR em Bezerras Vacinadas

Evaluation of the Persistence of the S19 Vaccine with Rose Bengal Test PCR in Vaccinated Calves

Letícia Marie Lira Umeda¹, Cleber Oliveira Soares², Grácia Maria Soares Rosinha²

¹ Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Filinto Müller 2443, Ipiranga, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil.

² Embrapa Gado de Corte, Avenida Radio Maia, 830, Campo Grande, MS 79106-55. *Autor para correspondência: gracia.rosinha@embrapa.br

Abstract

This study verified the persistence of S19 vaccine by Rose Bengal Test (RBT) and Polymerase Chain Reactions (PCR) in female calves aged six to eight months old. The primers used were B4 and B5. All animals were negative at RBT before vaccination. Five animals showed negative results at RBT throughout the sample period of the experiment. The percentage of positive animals at RBT throughout the experiment was 80,65%, 66,60%, 20,83%, 10,42%, 6,25% to 30, 90, 120, 150 e 180 days after vaccination, respectively. From the 210th day after vaccination, only one animal was positive to the test and this animal remained positive until 360 days after vaccination. In any blood sample was carried out PCR amplified product of B4 and B5. The results of RBT showed that one animal was still reagent, suggesting vaccine persisted in this animal. Using blood as sample and under these conditions, PCR is a technique that doesn't allow the evaluation of the persistence of a vaccine strain S19 on vaccinated calves.

Key words: Brucellosis, diagnostic, *Brucella abortus*, vaccine.

Resumo

Objetivou-se avaliar a persistência da vacina B19 pelo método sorológico AAT e molecular PCR em fêmeas bovinas vacinadas com idade entre seis a oito meses de idade. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR foram B4 e B5. Todos os animais apresentaram resultados negativos no AAT na coleta antes da vacinação. Cinco animais apresentaram resultados negativos durante todo o período de coleta. O percentual de animais positivos ao teste do AAT ao longo do experimento foi de 80,65%, 66,6%, 20,83%, 10,42%, 6,25% aos 30, 90, 120, 150 e 180 dias após a vacinação, respectivamente. A partir dos 210

dias após a vacinação somente um animal continuou positivo no AAT e esse mesmo animal permaneceu positivo até os 360 dias após a vacinação. Em nenhuma amostra de sangue realizada a PCR foi amplificado o produto dos oligonucleotídeos. Os resultados do AAT mostram que aos 360 dias um animal ainda era reagente, sugerindo a persistência da vacina neste animal. Utilizando o sangue como amostra e nas condições deste trabalho, a PCR não se mostrou como uma técnica que permite avaliar a persistência da cepa vacinal em bezerras vacinadas.

Palavras-chave: Brucelose, diagnóstico, *Brucella abortus*, vacina.

Introdução

A brucelose é uma zoonose de distribuição mundial causada pela bactéria *Brucella* spp., um cocobacilo, intracelular facultativo, responsável por grandes perdas econômicas, relacionadas principalmente a abortos em animais. Nos humanos, causa a doença conhecida como Doença de Malta, doença crônica com longo período de convalescência (Cutler et al., 2005; Songer & Post, 2005; Corbel et al. 2006).

A vacina B19 é a mais utilizada na prevenção da brucelose bovina, e foi produzida a partir de uma cepa esquecida em temperatura ambiente e sofreu atenuação natural e desde 1930 tem sido a mais utilizada para a vacinação de bezerras. O mecanismo dessa atenuação ainda não é bem entendido. Essa cepa possui baixa patogenicidade e alta imunogenicidade e a resistência que gera nos animais vacinados, dura por muitos anos. A principal desvantagem da vacina B19 é que por ser uma cepa viva e ter mantido sua característica lisa, induz a produção de anticorpos contra o antígeno O do lipopolissacarídeo (LPS), interferindo no diagnóstico sorológico. Porém se os animais forem vacinados na idade recomendada esses anticorpos desaparecem rapidamente e os mesmos são negativos nas principais provas sorológicas, desta

forma não é recomendada a vacinação de animais adultos (WHO, 1997; Paulin, 2006; Crasta et al., 2008).

Em alguns casos, animais vacinados com a B19 podem tornar-se persistentemente infectados (Alton, 1988). A eliminação da cepa vacinal B19 no leite foi estudada por Nicoletti (1991), onde, em animais vacinados com a dose padrão, 0,83% eliminou a cepa vacinal e 0,45% dos animais que receberam a dose reduzida da vacina eliminou a mesma.

A outra cepa vacinal é a RB51, derivada da cepa selvagem S2308 que sofreu atenuação por sucessivas passagens em meio com rifampicina (Olsen et al., 1999).

O diagnóstico da brucelose geralmente é realizado por métodos indiretos, baseados na detecção de anticorpos contra *B. abortus* e métodos diretos, que detectam o agente. O teste de soro aglutinação com AAT é um teste de triagem, por ser de fácil execução e de baixo custo. Neste teste, reações positivas podem ocorrer em animais vacinados com B19, desta forma, é recomendada a realização de outros testes com uma maior especificidade que o AAT. Este teste qualitativo, demonstra somente a presença de anticorpos da classe IgG1 e não a sua titulação (BRASIL, 2006; OIE, 2009).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método de amplificação de ácidos nucléicos rápido, de alta sensibilidade e especificidade (Coleman; Tsongalis, 2006) e permite a identificação de *Brucella* spp. em sangue, leite, urina, sêmen, tecido linfóide e material de aborto ou secreções de bovinos após o parto (O' LEARY et al., 2006; MOSQUERA et al., 2008).

Sharifi et al. (2008) citam como vantagem da PCR, em relação ao método microbiológico utilizados para a identificação de espécies, a velocidade que a PCR é realizada e também pela possibilidade da bactéria poder estar morta, o que é muito importante em relação a patogenia para humanos.

A excreção da cepa B19 tem sido relatada por diversos trabalhos na literatura (Nicoletti, 1991; Myashiro et al., 2007; Pacheco, 2012), e sua identificação é feita

principalmente a partir da urina e leite, por meio da PCR e cultivo microbiológico. A presença da cepa vacinal em amostras de leite e urina é uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a mesma pode causar a doença em humanos. Essa eliminação da B19 também é um importante fator na infecção de animais no rebanho e manutenção do agente no ambiente, uma vez que a mesma pode infectar machos e fêmeas fora da faixa etária em que a vacinação é obrigatória.

Objetivou-se neste estudo avaliar a persistência da vacina B19 por 12 meses pelos métodos sorológico AAT e molecular PCR em fêmeas bovinas vacinadas entre seis a oito meses de idade.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizadas 48 fêmeas bovinas da raça Caracu, com idade entre seis a oito meses, não vacinadas contra brucelose no início do experimento, provenientes do rebanho de melhoramento animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Ética na utilização de animais experimentais

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e aprovado com nº de registro: CEUA nº 555/2013.

Vacinação

Após a primeira coleta de sague, todas as bezerras foram vacinadas com vacina comercial viva, atenuada e liofilizada, de *Brucella abortus*, B19 por via subcutânea, na região pré-escapular, com no mínimo 60×10^9 unidade formadora de colônia (UFC) por dose.

Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular, em tubos com vácuo de 5 mL com e sem EDTA para posterior extração de DNA e separação do soro. Essas coletas foram realizadas no dia zero (antes da vacinação), 30, 60 dias e subsequentemente, até 12 meses após a vacinação, a cada 30 dias. O soro foi separado por meio de centrifugação a 7000 g por cinco minutos e foram armazenados a -20 °C até a realização do teste sorológico. O sangue total foi separado em alíquotas de 350 µL em tubos tipo eppendorf de 2 mL e armazenadas a -20 °C até o momento da extração de DNA.

Análise dos soros

Os soros foram analisados por meio do teste do antígeno acidificado tamponado (AAT) conforme a técnica recomendada pelo Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (Brasil, 2006).

Extração de DNA das amostras de sangue

A extração de DNA do sangue total foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Araújo et al. (2009). A qualidade e concentração do DNA extraído foram estimadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Sybr Gold e visualizados em transiluminador ultravioleta e comparadas com o DNA λ de concentrações conhecidas de 50ng e 100ng (Sambrook et al., 1989).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores gênero específicos B4 (5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3') e B5 (5' GTC TGG ACT TTC CGT TCG CGC 3'), descritos por Baily et al. (1992) que amplificam um fragmento de 223 pares de bases,

referente ao gene *bcps31* que codifica uma proteína imunogênica de 31 KDa. A PCR foi realizada utilizando-se os DNAs extraídos e como controle positivo nas reações o DNA extraído da cepa vacinal B19 e de *B. abortus* S2308. Como controle interno da reação, foi utilizada água livre de nucleases.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µL. Cada reação contendo 13,5 µL de água ultrapura, 0,03mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP's, 5 pMol de cada oligonucleotídeo, 1,5 U de taq DNA polimerase e aproximadamente 100 ng de DNA. Os ciclos das PCR foram realizados segundo descrito por Baily et al. (1992).

Resultados

Todos os animais apresentaram resultados negativos ao teste do AAT na coleta antes da vacinação. Cinco animais apresentaram resultados negativos durante todo o período de coleta.

Trinta dias após a vacinação, 25 de 31 animais (80,64%) em que foi realizada a coleta apresentaram resultados positivos ao AAT. A maioria dos animais soroconverteram aos 60 dias após a vacinação, quando 42 de 48 animais (87,5%) foram positivos. Um animal apresentou resultado positivo aos 60 dias após a vacinação e nas coletas subsequentes não apresentou reação de aglutinação no AAT, até os 360 dias após a vacinação. Noventa dias após a vacinação 32 de 48 animais (66,66%) mantiveram positivos. Aos 120 dias, dez de 48 animais (20,83%) mantiveram positivos. Cento e cinquenta dias após a vacinação cinco de 48 animais (10,42%) foram positivos e 180 dias após a vacinação três de 48 animais (6,25%) apresentaram resultados positivos ao AAT. A partir dos 210 dias após a vacinação somente um animal apresentou aglutinação ao AAT, permanecendo positivo até a última colheita aos 360 dias após a vacinação. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

O DNA de *B. abortus* não foi detectado por meio da PCR em nenhum animal durante o período de coleta de sangue, utilizando-se os oligonucleotídeos B4 e B5 (Figura 1).

Discussão

A vacinação contra brucelose é uma medida compulsória para que ocorra uma diminuição da prevalência da doença no território nacional. Essa vacinação com a cepa B19 deve ser realizada somente em fêmeas com idade entre três a oito meses com o intuito de evitar a ocorrência de reações falso-positivas nos testes de triagem estabelecidos no PNCEBT (Brasil, 2006).

Todos os animais foram soronegativos no dia zero no teste do AAT, indicando que os animais eram livres da doença no dia da vacinação. Os resultados demonstram que a maioria dos animais (93,75%) não apresentou reação de aglutinação no teste do AAT aos 180 dias após a vacinação enquanto Mathias et al. (2001) encontraram 80,56% dos animais negativos ao teste do AAT em bezerras nelore vacinadas ao 18 meses de idade, sugerindo que a partir de 180 dias após a vacinação os títulos de anticorpos já decrescem na maioria dos animais vacinados com a cepa B19.

Quarenta e três animais (89,58%) em algum momento do período do experimento apresentaram reação positiva ao teste do AAT, indicando que houve persistência da vacina na maioria das bezerras utilizadas no estudo.

A maioria das aglutinações ao teste do AAT ocorreu aos 60 dias após a vacinação, resultado que difere do encontrado por Koloda (2005), no qual 100% dos animais foram reagentes ao AAT aos 30 dias após a vacinação e de Mathias et al. (1998), no qual o pico foi aos 14 dias após a vacinação. Porém o resultado deste trabalho não difere muito do encontrado por Mathias et al. (2001) e Martinez-Herrera et al. (2012) em que 100% dos animais foram positivos aos 45 dias após a vacinação. Essa variação pode ser devido ao

intervalo de tempo em que as coletas de soro foram realizadas, onde a maioria das soroconversões podem ter ocorrido entre os 30 e 60 dias. A máxima produção de anticorpos da classe IgG ocorre após 28 a 42 dias da infecção ou vacinação (Navarro, 1995), explicando assim essa variação da máxima soroconversão presente na literatura pelo AAT.

Segundo Acha e Szyfres (2001), o período entre a infecção e o aparecimento de anticorpos varia de semanas a vários meses e que este intervalo de tempo está relacionado com fatores de virulência e dose da bactéria, via de infecção e a susceptibilidade do animal. A dose utilizada por Mathias et al. (2001) foi de $60-120 \times 10^9$ bactérias viáveis, enquanto a utilizada por Martinez-Herrera et al. (2012) foi de 10×10^{10} UFC.

Aos 210 dias somente um animal apresentou reação de aglutinação no AAT, permanecendo este mesmo animal positivo até o final das coletas, aos 360 dias. Isso difere de trabalhos na literatura, sendo aos 300 dias apenas um animal continuava a apresentar aglutinação no AAT e aos 360 (Koloda, 2005) e 259 dias (Mathias et al., 1998) todos os animais foram negativos ao teste. Já no estudo de Martinez-Herrera et al. (2012), todos os animais foram negativos ao AAT, 225 dias após a vacinação.

Reações falso-positivas podem ocorrer pela presença de anticorpos não específicos, isso devido a infecções por outras bactérias como *Escherichia coli* O:157, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* O:30, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas maltophilia* e *Vibrio cholera* O:1., ou interferência de anticorpos vacinais relacionados à vacina B19. Os títulos de anticorpos podem persistir por um longo período em uma pequena porcentagem dos animais vacinados e essa porcentagem aumenta com a idade em que esses animais foram vacinados (ALTON, 1988; BRASIL, 2006; CORBEL et al., 2006). Outro fator é a característica do teste AAT utilizado no soro dos animais, que por ser um teste de macro aglutinação, que utiliza grandes volumes de soro e antígeno, e que também é um teste qualitativo e não quantitativo pode ter influenciado no resultado deste animal. A utilização de

testes quantitativos poderia indicar uma titulação de anticorpos, que apesar de causar aglutinação em testes qualitativos como o AAT e classificar o animal como positivo, não seria suficiente para considerá-lo com títulos de indivíduo positivo. Outra influência é a resposta imune indivíduo-dependente, que pode ter gerado níveis de anticorpos persistentes neste animal.

Uma bezerra apresentou resultado positivo aos 60 dias após a vacinação e nas coletas subsequentes não apresentou reação de aglutinação no AAT, até os 360 dias após a vacinação. Situação semelhante foi encontrada por Koloda (2005) e Mathias et al. (1998), e que atribuíram o fato a condições de manejo estressante. O AAT, por ser um teste qualitativo, indica a presença de anticorpos da classe IgG1 e não a sua titulação. Nessa bezerra, provavelmente o título de anticorpos presentes no soro não seria suficiente para classificá-la como positiva em testes quantitativos ou essa resposta pode ter relação com uma resposta imune indivíduo-dependente, onde cada animal reage de forma diferente frente ao mesmo desafio imunológico.

Cinco animais permaneceram negativos durante todo o período do experimento. Em outro estudo na literatura, dois animais permaneceram negativos durante todo o período do experimento (Koloda, 2005). Tal fato pode ser atribuído a falha na montagem da resposta imune humoral ou um erro durante a vacinação.

Para minimizar a interferência que a vacina B19 causa nos testes sorológicos oficiais, os animais devem ser vacinados entre três a seis meses, pois animais mais jovens permanecem com anticorpos vacinais por um tempo mais curto (Bahena et al., 2003).

Em uma reação de PCR, sucessivos ciclos de amplificação são realizados, nos quais a enzima DNA polimerase faz cópias da sequência de ácidos nucleicos alvo a partir de um molde de DNA. Assim a cada ciclo, os novos produtos de amplificação servem como molde

para o próximo ciclo e ao longo da reação, a concentração da sequência alvo aumenta exponencialmente (Coleman & Tsongalis, 2006).

Não houve a amplificação da sequência alvo em nenhum momento nas amostras de sangue em que foi realizada a extração de DNA. Existem poucos trabalhos que visaram a detecção do DNA da *B. abortus* B19 após vacinação. Martinez-Herrera et al. (2012) utilizaram a técnica de PCR em amostras de sangue de bezerras vacinadas colhidas aos 45 e 135 dias após a vacinação com a cepa B19. Foram utilizados os oligonucleotídeos ery 1 e ery 2 e em nenhuma coleta foi observado o produto de amplificação da PCR, o mesmo ocorrendo em bioensaio prévio realizado com as amostras de sangue do presente estudo (dados não apresentados). Os oligonucleotídeos ery 1 e ery 2 (Sangari et al. 1994) permitem a diferenciação entre as cepas S2308 e B19. A cepa vacinal possui uma deleção de 702 pb no gene *ery*, responsável pelo catabolismo do eritríto, e desta forma amplifica um fragmento de 361 pb, enquanto a cepa S2308 amplifica um fragmento de 1063 pb.

Em camundongos injetados intraperitonealmente com *B. abortus* viva ou inativadas pelo calor, os animais não apresentaram sintomas de septicemia e as bactérias foram isoladas do sangue antes de uma hora pós-inoculação e a bacteremia persistiu por 48 horas (Barquero-Calvo et al. 2007). Desta forma, como foi utilizado o sangue como fonte de DNA de *Brucella* spp. a ser utilizado na reação de PCR, talvez o período de detecção do DNA pela técnica seja de apenas horas após a aplicação da vacina, onde as bactérias estariam circulantes no sangue do animal.

Baek et al. (2005) avaliaram a infecção intrauterina com *B. abortus* biotipo 1 em camundongos por meio de métodos microbiológicos, sorológicos e por AMOS-PCR (ensaio que permite identificar as espécies de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* e *B. suis*). Os autores inicialmente utilizaram amostras de sangue e tecido nas reações de AMOS-PCR, porém os

resultados obtidos com as amostras de sangue foram muito variáveis e desta forma foram analisados somente as amostras de tecidos.

Mosquera et al. (2008) realizaram PCR com os oligonucleotídeos B4 e B5 em 17 amostras de DNA de sangue de bovinos pertencentes a propriedades com antecedentes de brucelose com objetivo de avaliar a técnica na detecção de *B. abortus*. Dezesesseis amostras foram positivas na PCR, concluindo os autores que a técnica poderia ser confiável para o diagnóstico da doença. Neste estudo, não houve amplificação da sequência alvo em nenhum momento, nas amostras de DNA extraídas do sangue das bezerras vacinadas, utilizando-se os oligonucleotídeos B4 e B5. Provavelmente pelas condições do rebanho no presente estudo diferirem daquelas nas quais foi realizado o estudo de Mosquera e colaboradores, uma vez que todos os animais utilizados eram livres de brucelose.

Os oligonucleotídeos iniciadores B4 e B5 possuem um nível de detecção bom, sendo relatado na literatura que é possível detectar 700 UFC/mL no sangue periférico (Yu & Nielsen, 2010), 4×10^2 UFC em 40 μ L de sangue e 10 UFC por mL de leite (Mosquera et al. 2008)

Há estudos na literatura em que foi encontrado DNA de *B. abortus* cepa B19, por meio da técnica de PCR em leite, urina e queijo de animais vacinados. Pacheco et al. (2012) avaliou a excreção da cepa B19 por fêmeas vacinadas entre três a oito meses de idade por meio da PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos B4 e B5 e em reação multiplex foram utilizados, para identificação de cepa selvagem ou vacinal os oligonucleotídeos ery 1 e ery 2. De 420 amostras, 86 (20,5%) foram positivas na PCR, e a maioria das amostras positivas foi de urina e todas foram identificadas como a cepa vacinal B19.

Myashiro et al. (2007) analisaram amostras ilegais de queijo, por meio do cultivo microbiológico e da PCR, utilizando os oligonucleotídeos ery 1 e ery 2. Das 192 amostras,

37 (19,27%) foram positivas na PCR como sendo *B. abortus*, destas, 30 (81,08%) foram identificadas como cepa B19 e sete (18,92%) como cepa selvagem.

Foram isoladas 11 cepas de campo de *B. abortus* de leite de vacas. A partir desses isolados, foram realizadas duas PCR para a diferenciação dos mesmos. A primeira visava à diferenciação da cepa RB51 de *B. abortus*, na qual nenhum isolado correspondeu a esta cepa vacinal. Entretanto, na diferenciação entre B19 e cepas selvagens, dois isolados corresponderam à cepa vacinal (Chavarría et al., 2006).

Esses estudos mostram que há excreção da cepa B19, e que a PCR mostra-se ser uma boa técnica para essa avaliação. Porém nesses trabalhos foram utilizados amostras de leite e urina, locais de escolha para a permanência e multiplicação das bactérias no organismo do animal.

No presente estudo, foi utilizado o sangue como amostra e nestas condições a PCR não se mostrou como uma técnica que permite avaliar a persistência da cepa vacinal em bezerras vacinadas. Ao contrário, os resultados do AAT demonstraram que o teste permite avaliar a persistência da amostra vacinal B19 em bezerras vacinadas, uma vez que, com 360 dias um animal ainda era reagente, sugerindo desta forma que o houve a persistência da vacina B19 nesse animal por 12 meses após vacinação.

A persistência da vacina B19 nos animais é um fator importante para a saúde pública e também na infecção de rebanhos. A determinação do período em que a vacina permanece nos animais é uma forma de evitar a infecção de demais animais do rebanho por esta cepa, uma vez que existem relatos na literatura da excreção da cepa B19 em fêmeas vacinadas na idade recomendada.

Referências

Alton GG., Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Paris : Institut Nacional de la Recherche Agronomique.

Araújo FR, Ramos CAN (2009). Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Comunicado Técnico Embrapa.

Baek KB, Lee OB, Hur J, Rahman MS, Lee IS, Kakoma I (2005). Evaluation of the Sprague-Dawley rat as a model for vertical transmission of *Brucella abortus*. Can. J. Vet. Res., 69(4): 305-308.

Baily, GG, Krahn, JB, Drasar, BW, Stoker, NG (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg., 95(4), 271-275.

Bahena AA, Aparicio ED, Andrade LH, González RP, Silva EA, Güemes FS (2003). Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. Téc Pecu Méx. 41(2): 129-140.

Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss D S, Guzman-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. Plos One. 2(7) : 1-14.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal. Programa Nacional de Controle e

Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 184p.

Chavarría LCM, Rodríguez AV, Castro RH (2006). Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. Vet. Mex., 37(4): 479-486.

Coleman WB, Tsongalis GJ (2006). The Polymerase Chain Reaction. In: Coleman WB, Tsongalis GJ (2nd ed) Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian, Humana Press: Totowa, 47-55.

Corbel MJ, Elberg SS, Cosivi O. (2006). Brucellosis in humans and animals. Geneva: WHO Press, 102.

Crasta OR; Folkerts O; Fei Z; Mane SP; Evans C; Martino-Catt S; Bricker B; Yu G; Du L; Sobral BW (2008). Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. Plos One 3(5): 1-13.

Cutler S J, Whatmore AM, Commander NJ (2005). Brucellosis – new aspects of an old disease. J. Appl. Microbiol. 98(6): 1270-1281.

Koloda, M (2005). Cinética de produção de anticorpos em bezerras imunizadas com a cepa B19 de *Brucella abortus* (Frederick Bang, 1897). Tese Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

Martinez-Herrera, Padron-Tello O, Peniche-Cardena A, Villagomez-Cortes JA, Pulido-Camarillo E, Lopez-Merino A, Morales-Alvarez JF, Rodriguez-Chessani M, Barradas-Piña FT, Flores-Castro R (2012). Identification of immunotolerance in the progeny of cows infected with *Brucella abortus*. Afr. J. Microbiol. Res. 6(29): 5841-5846.

Mathias LA, Pinto AA, Gonçalves EI (1998). Persistência de anticorpos aglutinantes e fixadores de complemento em bezerras vacinadas com *Brucella abortus* cepa B19. Semina (Londrina, Braz.) 5(6): 40-43.

Mathias LA, Chaves LF, Chen AA, Girio RJS, Valério Neto W (2001). 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* cepa B19. Pesq. Vet. Bras. 21(4): 139-142.

Mosquera CX, Bernai VC, Muskus LC, Berdugo GJ (2008). Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. Rev. MVZ- Córdoba 13(3): 1504-1513.

Myashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME (2007). Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). Braz. J. Microbiol. 38(1):17-22.

Navarro F (1995). Determinación de la prevalencia serológica de la brucelosis bovina en distintas zonas de la república Argentina. Disponível em: <http://www.produccion->

animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/06-determinacion_de_la_prevalencia.pdf. Acesso em 07 Fev. 14.

Nicoletti P (1991). Vaccination – Bovine Brucellosis. Networking in Brucellosis Research Workshop, Networking in Brucellosis Reserach; 85-92.

OIE. 2009. Bovine Brucellosis. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCEL L.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCEL_L.pdf). Acesso em: 24/05/12.

Olsen SC, Cheville NF, Bricker B, Jensen, AE, Palmer M, Stevens, M (1999). Informe técnico sobre la vacunación del ganado con la cepa RB51 de *Brucella abortus*. Disponível em: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/18-informe_vacunacion_brucela_cepa_rb51.pdf. Acesso em 10 Abr. 13.

Pacheco WA, Genovez ME, Pozzi CR, Silva LMP, Did CC, Piatti RM, Pinheiro ES, Castro V, Myashiro S, Gambarini ML (2012). Excretion of *Brucella abortus* vaccine S19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Braz. J. Microbiol.* 43(2):594-601.

Paulin LMS (2006). Estudo comparativo de diferentes técnicas sorológicas para diagnóstico de infecções por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). Tese Doutorado, Universidade de São Paulo.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sangari FJ, Agüero J (1994). Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the *ery* locus. *Vaccine*. 12(5): 337-342.

Sharifi Y, Khazrainia P; Zahraei Salehi T, Behroozikhah AM (2008). Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella* in Iran. *Iran. J. Vet. Res.* 9(1): 19-24.

Songer JG & Post KW (2005). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. 1^a ed. Editora Saunders. 299p.

WHO. 1997. *The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting*. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.14.pdf. Acesso em: 24/05/2012.

Yu WL & Nielsen K (2010) Review of detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction. *Croat. Med. J.* 51(4): 306-313.

Tabela 1 – Resultados do teste de antígeno acidificado tamponado (AAT) de 48 soros de bezerras da raça Caracu com idades entre 6 a 8 meses, vacinadas com a vacina B19.

Dias após a vacinação	Positivos ao teste do AAT	
	n	%
0	0	0
30	25*	80,64
60	42	87,5
90	32	66,66
120	10	20,83
150	5	10,42
180	3	6,25
210	1	2,08
240	1	2,08
270	1	2,08
300	1	2,08
330	1	2,08
360	1*	3,22

* Nesta coleta, foi realizado o teste do AAT somente em 31 soros.

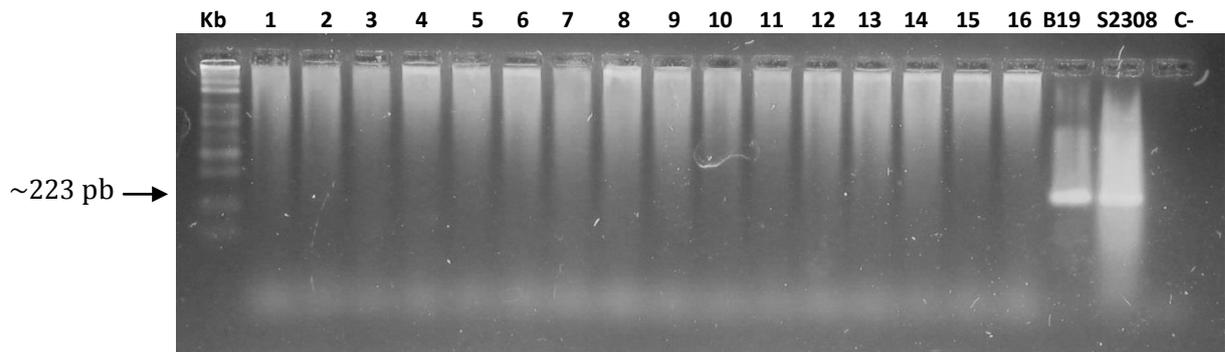


Figura 1. Reação de PCR com os oligonucleotídeos B4 e B5 (Baily et al., 1992) para detecção da cepa vacinal B19 de *Brucella abortus* em bezerras vacinadas. Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com SYBR GOLD (Invitrogen®) sob transiluminação UV. Canaletas 1 a 16 DNA de sangue de animais após a vacinação com B19. Canaletas B19 e S2308, controles positivos da reação, as quais geraram bandas de aproximadamente 223 pb. Canaleta C- controle interno da reação (sem DNA). Kb corresponde ao marcador de pb 1 Kb DNA Plus Invitrogen®.