

**BRUCELOSE EM TOUROS: UMA VISÃO DA DOENÇA NO BRASIL COM ÊNFASE  
AO DIAGNÓSTICO E SUA IMPORTÂNCIA AO AGRONEGÓCIO**

**BRUCELLOSIS IN BULLS: AN OVERVIEW OF THE DISEASE IN BRAZIL,  
EMPHASIZING DIAGNOSES IN BULLS AND ITS IMPORTANCE IN  
AGRIBUSINESS**

\* GERALDO DE NARDI JÚNIOR<sup>1</sup>  
MÁRCIO GARCIA RIBEIRO<sup>2</sup>  
FABIO MORATO MONTEIRO<sup>3</sup>  
THIAGO LUVISUTTO DE JESUS<sup>4</sup>  
RAFAEL MACIEL VIEIRA<sup>4</sup>

Recebido em Setembro de 2012. Aceito Outubro em 2012.

---

1-Disciplina de Produção Animal, Faculdade de Tecnologia de Botucatu – FATEC-BT, Av. José Ítalo Bacchi s/n, CEP: 18606-855, Botucatu, SP. \* Autor para correspondência: [gedenardijr@yahoo.com.br](mailto:gedenardijr@yahoo.com.br)

2-Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu–SP.

3-Agência Paulista de Tecnologia em Agronegócio (APTA), Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho-SP, Brasil. Endereço Rodovia Carlos Tonani, km 94, Caixa Postal 63, CEP: 14160-970, Sertãozinho-SP.

4-Acadêmicos do curso de Tecnologia em Agronegócio da Faculdade de Tecnologia de Botucatu-SP – FATEC-BT.

## **BRUCELOSE EM TOUROS: UMA VISÃO DA DOENÇA NO BRASIL COM ÊNFASE AO DIAGNÓSTICO EM TOUROS E SUA IMPORTÂNCIA AO AGRONEGÓCIO**

### **RESUMO**

A brucelose bovina causada pela *Brucella abortus* é reconhecida como doença de evolução crônica e de potencial zoonótico, que acarreta grandes prejuízos nos rebanhos advindos de abortamentos, nascimento de fetos debilitados, descarte precoce de animais, redução na produção de leite e de carne, bem como restrições no comércio internacional de produtos de origem animal, sendo de suma importância ao agronegócio nacional. Nos touros, a doença está praticamente restrita ao trato genital, caracterizada principalmente por vesiculite seminal e inflamação de outras glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino. Ao contrário das vacas, nos touros a infecção por *B. abortus* induz baixos títulos ou mesmo ausência de anticorpos séricos, fato que dificulta o diagnóstico sorológico por métodos convencionais. O presente estudo revisou os principais aspectos da brucelose em touros bovinos no Brasil, com ênfase aos métodos de diagnóstico e sua importância ao agronegócio.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agronegócio. *Brucella abortus*. Brucelose. Diagnóstico. Touro

**BRUCELLOSIS IN BULLS: AN OVERVIEW OF THE DISEASE IN BRAZIL,  
EMPHASIZING DIAGNOSES IN BULLS AND ITS IMPORTANCE IN  
AGRIBUSINESS**

**SUMMARY**

Bovine brucellosis, caused by *Brucella abortus*, is recognized as a chronic evolution disease with zoonotic potential what causes great loss in cattle herd due to abortion, impaired births, early animal discarding, reduction on milk and meat production as well as restriction within animal product international trade which is of high importance for national agribusiness. In bulls the disease is restricted to genital tract, characterized by seminal vesiculite and inflammation of accessory glands of the male reproductive system. Unlike cows, in bulls infection by *B. abortus* induces low levels or absence of serum antibodies what makes it difficult serodiagnosis by conventional methods. This paper reviewed the main aspects of brucellosis in bulls in Brazil, emphasizing diagnosis methodology and its importance to agribusiness.

**KEY WORDS:** Agribusiness. *Brucella abortus*. Brucellosis. Diagnosis. Bull

## 1 INTRODUÇÃO

A brucelose bovina é uma doença infectocontagiosa causada pela *Brucella abortus* (*B. abortus*), caracterizada por manifestações clínicas da esfera reprodutiva e severos prejuízos aos produtores (ACHA; SZYFRES, 2003). Na América Latina, as perdas econômicas devido à brucelose são da ordem de 600 milhões de dólares/ano. No Brasil, os prejuízos com a brucelose em bovinos foram estimados em 100 milhões dólares/ano (FOLHA DE SÃO PAULO, 2000).

O produto interno bruto (PIB) do estado de São Paulo é estimado em cerca de 727 bilhões de reais, equivalente a 33,9% do PIB do Brasil. A atividade agropecuária constitui 1,5% desse total, correspondente a 18,7% do PIB agropecuário do país (SÃO PAULO, 2005). O rebanho bovino brasileiro é estimado em 200 milhões de animais (IBGE, 2006). Neste cenário, faz-se importante considerar que o aparecimento de problemas sanitários, como a brucelose, impacta de forma acentuada a unidade produtiva, particularmente a cadeia agroindustrial, restringindo mercados e determinando prejuízos na produção (DIAS et al., 2009).

Os sinais clínicos da brucelose estão relacionados principalmente à esfera reprodutiva. Nas vacas, a doença se caracteriza por abortamentos, metrite e retenção de placenta (VASCONCELLOS et al.,

1987). Nos touros, a patogenicidade do agente está associada à infecção das glândulas acessórias e aos testículos (HAFEZ, 1995), manifestada principalmente por vesiculite e, secundariamente, por quadros de orquite e epididimite (RADOSTITS et al., 2007), levando frequentemente os animais infectados a sub e/ou infertilidade (NICOLETTI, 1986).

A fertilidade é, inquestionavelmente, uma das mais importantes características de produção a ser considerada, tanto nos sistemas de produção de carne quanto nos de leite. Economicamente, o mérito reprodutivo é cinco vezes mais rentável para o produtor de bezerros do que o desempenho no crescimento, e dez vezes mais significativo do que a qualidade do produto. Esses aspectos ilustram os reflexos da atividade reprodutiva nos criatórios de bovinos (BARBOSA et al., 2005).

Inquérito sorológico realizado pelo PNCEBT – MAPA, no Brasil, em 2009, em 15 estados, mostrou prevalência variável nas diferentes regiões da Federação, tão baixa quanto 0,06% de animais infectados no estado de Santa Catarina (SIKUSAWA et al., 2009), como taxas elevadas de 12% no estado de Mato Grosso do Sul (CHATE et al., 2009). Particularmente no estado de São Paulo, foi constatada prevalência de 3,8% de animais infectados, e a compra de reprodutores e propriedades com mais de 87

cabeças foram os principais fatores de risco relacionados à doença (DIAS et al., 2009).

Considerando o grande rebanho bovino no Brasil, o potencial zoonótico da brucelose, o impacto negativo da doença nos plantéis e a dificuldade do diagnóstico da doença em touros, o presente estudo tem como objetivo revisar os principais aspectos da brucelose, com ênfase aos métodos de diagnóstico em touros.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Propriedades gerais do gênero *Brucella*

A brucelose é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Brucella*, que se apresentam microbiologicamente como cocobacilos Gram-negativos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis, desprovidos de cápsulas e não formadores de esporos (NIELSEN et al., 2004). Possuem metabolismo oxidativo baseado na utilização de nitratos. Nos testes bioquímicos, são classificados como microrganismos catalase e oxidase positivos, não fermentadores da lactose (PAULIN, 2003), urease positivos (reação em poucos minutos) e indol negativos (QUINN et al., 2005).

Microrganismos do gênero *Brucella* são intracelulares. A patogenia e a natureza da resposta imune estão intimamente

relacionadas à presença da bactéria no interior de fagócitos (GONZALEZ et al., 2006).

*B. abortus* é isolada entre 3 a 5 dias no ágar-*Brucella* ou no meio convencional de ágar enriquecido com sangue ovino ou bovino a 5% (desfibrinado), em condições de microaerofilia, a 37°C. A partir de 3 dias de incubação, as colônias apresentam 2 a 3 mm de diâmetro, são opacas, lisas e não hemolíticas (NIELSEN; DUNCAN, 1990; QUINN et al., 2005). No cultivo microbiano de materiais suspeitos sujeitos à contaminação bacteriana secundária, são recomendados meios seletivos como o Farrel, constituídos de vários antimicrobianos e antifúngicos impeditores para outros microrganismos (NIELSEN; DUNCAN, 1990).

As brucelas são divididas em dois grandes grupos antigenicamente distintos, denominadas lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) e rugosas (*B. ovis* e *B. suis*) [METCALF et al., 1994], diferenciadas com base nas características de primo-isolamento em meios de cultura e na estrutura da parede bacteriana (NIELSEN et al., 2001).

As brucelas não apresentam espécie-especificidade. No entanto, mostram certa predileção por determinados hospedeiros. Dentre as brucelas lisas, *B. abortus* acomete preferencialmente bovinos, búfalos e equinos, enquanto *B. suis* e *B. melitensis*

infectam, respectivamente, suínos e caprinos. Nas brucelas rugosas, *B. canis* é o principal agente causal da brucelose em canídeos e *B. ovis* em ovinos (NIELSEN et al., 2001; RIBEIRO et al., 2008).

O gênero *Brucella* spp possui vários biotipos ou biovares (biovariantes). A diferenciação dos biotipos é fundamentada no requerimento de CO<sub>2</sub>, na produção de H<sub>2</sub>S, na multiplicação na presença de tionina e fucsina básica, na aglutinação com antissoros monoespecíficos (A, M, R) e na lise por bacteriófagos (NIELSEN; DUNCAN, 1990; QUINN et al., 2005). Considera-se que *B. abortus* possua 7 biotipos, embora maior número tenha sido descrito até o momento, mas não reconhecido na rotina de caracterização atual da espécie (NIELSEN; DUNCAN, 1990). Assume-se, também, que *B. suis* possua 5 biotipos e *B. melitensis* 3, enquanto *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae* não apresentariam biovariantes (QUINN et al., 2005). NIELSEN; DUNCAN (1990) postularam que todas as espécies do gênero *Brucella* reconhecidas atualmente teriam derivado de *B. abortus* biotipo 2.

As biovariantes apresentam certas diferenças quanto à predileção pela infecção em determinadas espécies animais (NIELSEN, 1990). Em todo o mundo, a brucelose em bovinos é causada predominantemente pelo biotipo 1 (BISHOP et al., 1994). Estudo realizado em 37 países visando o isolamento de *B. abortus* das

principais espécies domésticas constatou que, dentre 266 linhagens isoladas de bovinos, 241 (90,6%) foram de vacas, pertencentes predominantemente aos biotipos 1, 2 e 3, reforçando a espécie bovina como o principal reservatório de *B. abortus* (NIELSEN; DUNCAN, 1990).

No Brasil, até 1985, foram descritos os biotipos 1, 2 e 3 de *B. abortus*, e o biotipo 1 em isolados de *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis* (GARCÍA CARRILLO, 1990).

MEGID et al. (2005) investigaram a caracterização de biótipos em linhagens de *B. abortus* isoladas de quatro fetos bovinos e um bubalino abortados no estado de São Paulo. Foram identificados o biotipo 1 (um feto bovino e um feto bubalino), biotipo 2 (um feto bovino) e biotipo 3 (dois fetos bovinos), se caracterizando como o primeiro registro nacional de identificação de biovariantes em linhagem de *B. abortus* isolada de feto bubalino. No mesmo estudo, os autores ressaltaram o predomínio dos biotipos 1, 2 e 3 nos abortamentos nestas espécies animais.

## 2.2 Epidemiologia

*B. abortus* é transmitida entre os bovinos principalmente por pastagem e água contaminadas e, secundariamente, por fetos, descargas uterinas, leite e sêmen (ACHA; SZYFRES, 2003). A bactéria é encontrada viável e em concentrações

elevadas no feto abortado, na placenta e secundinas (VASCONCELLOS et al., 1987).

A brucelose possui distribuição mundial (FERRAZ, 1999; RADOSTITS et al., 2007), exceto nos países que a erradicaram utilizando ações sistemáticas de controle, como certos países da Europa, EUA e Japão (MOLNÁR et al., 1997).

Dentre os ruminantes domésticos, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados, embora também possa ocorrer pelo contato direto com animais infectados, pelo sêmen ou ingestão de leite (ACHA; SZYFRES, 2003; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). A transmissão vertical pode desencadear o estado de “portador latente”, fenômeno relatado entre 1 a 9% das novilhas nascidas de fêmeas infectadas. Estes animais apresentam-se sorologicamente negativos ou com títulos oscilantes (NIELSEN; DUNCAN, 1990), fato que gera grandes dificuldades nas ações de diagnóstico e consequente controle da doença, com base em testes sorológicos convencionais (BISHOP et al., 1994).

Os microrganismos do gênero *Brucella* resistem às condições adversas do ambiente (GONZALEZ et al., 2006), incluindo extremos de pH, temperatura e luz solar direta (NIELSEN, 1995). Podem resistir por seis meses ou mais na água, em pastos contaminados, nos fetos abortados, em restos de placenta, nas fezes, na lã, no

feno ou no solo (LUCERO et al., 2008; BRASIL, 2009).

No leite e derivados, mantêm-se viáveis por vários meses (OMER et al., 2000). No entanto, a fervura e temperaturas usuais de pasteurização destroem o microrganismo (PAULIN, 2003). Desinfetantes clorados (2,5% de cloro ativo), soluções de formaldeído (2%) e compostos fenólicos (2,5%) inativam o microrganismo a partir de 15 minutos de exposição (CASTRO et al., 2005). O álcool (70%) destrói prontamente a bactéria (PAULIN, 2003). Já sob ação do carbonato de cálcio (1:10), o microrganismo é inativado após 30 minutos de exposição (OMER et al., 2000).

Ao se considerar o touro isoladamente nos plantéis, conclui-se que a importância da fertilidade do macho é muito maior do que a de qualquer fêmea individualmente, visto que o touro pode se acasalar com número muito maior de fêmeas, na monta natural ou quando se considera a inseminação artificial (BARBOSA et al., 2005).

As principais causas de baixa fertilidade ou de infertilidade em touros criados no Brasil - independentemente da constituição genética - são degeneração testicular, maturidade sexual retardada, hipoplasia testicular, espermiogênese imperfeita e imaturidade sexual. Todos esses distúrbios ocorrem como

consequência de fatores ligados ao ambiente desfavorável, procedimentos de manejo incorretos, fatores de ordem genética e, principalmente, de origem infecciosa (HAFEZ, 1995; BARBOSA et al., 2005). Pelo exame andrológico completo, podem ser detectadas alterações do desenvolvimento do sistema genital, anomalias regressivas, patologias progressivas e alterações inflamatórias, oriundas ou não de doenças infecto-contagiosas nos diversos órgãos, bem como distúrbios na libido e na habilidade de cópula. Essas alterações levam tanto à incapacidade de fertilização como de monta, em graus variáveis, determinando quadros de subfertilidade e/ou de infertilidade nos machos dos plantéis (BARBOSA et al., 2005).

### 2.3 Patogenia

O ingresso da *Brucella* sp em rebanhos bovinos livres determina, inicialmente, elevado número de abortamentos (ACHA; SZYFRES, 2003). Nas gestações subsequentes, a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente os abortamentos reincidem na terceira prenhez. Após a fase aguda sobrevém à crônica, quando abortam somente as vacas recém-introduzidas no rebanho e as novilhas (BISHOP et al., 1994; RADOSTITS et al., 2007).

As brucelas penetram no organismo dos mamíferos pelas mucosas do trato digestório, genital, nasal, conjuntiva ocular e/ou por soluções de continuidade da pele.

Em bovinos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. A partir do trato digestório, a bactéria é carregada para os linfonodos mesentéricos e fagocitada ativamente por fagócitos, principalmente macrófagos. Nos fagócitos podem permanecer quiescentes por vários meses. A bacteremia ocorre por cerca de duas semanas nos bovinos, com o microrganismo livre no plasma ou no interior dos macrófagos (NIELSEN; DUNCAN, 1990).

*B. abortus* possui tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, como baço, fígado e linfonodos (BATHKE, 1988; ACHA; SZYFRES, 2003). A multiplicação da bactéria é estimulada pelo produto da degradação do álcool eritritol, presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores femininos e masculinos. O eritritol é produzido em grandes concentrações no útero gravídico, notadamente nos líquidos fetais, nos placentomas e no tecido córion-alantoideano (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). A presença do eritritol no útero gravídico justificaria, em parte, a brucelose como doença da esfera reprodutiva em certas espécies, incluindo os bovinos (KINDAHL et al., 2004).

Nos touros, a brucela se instala principalmente nos órgãos acessórios do sistema reprodutivo, particularmente na vesícula seminal e próstata, podendo ser eliminada pelo sêmen (SUTHERLAND, 1980). No aparelho reprodutivo masculino, a brucela pode levar à reação inflamatória do tipo necrosante nas vesículas seminais, testículos e epidídimos, com aumento de seu volume uni ou bilateral, provocando subfertilidade ou infertilidade. Como sequela pode determinar atrofia do testículo e órgãos acessórios (JOINT, 1986).

HAFEZ; HAFEZ (2004) descreveram que touros com brucelose podem apresentar intensa reação inflamatória nos testículos, levando à degeneração dos túbulos seminíferos, epididimite com infiltração de linfócitos, neutrófilos e células gigantes com espermatozoides mortos, vesiculite com inflamação uni ou bilateral das vesículas seminais e glândulas aumentadas e fibrosadas.

A infecção por bactérias do gênero *Brucella*, em machos, induz resposta imune do tipo celular e humoral. A resposta humoral frente à infecção natural pelo microrganismo se notabiliza pela elevação quase simultânea dos níveis de imunoglobulinas (Ig) das classes IgM e IgG. Nestes animais, as Ig da classe IgM tendem ao desaparecimento algumas semanas após a infecção. Ao contrário, a classe IgG, se estabelece e persiste nos

animais cronicamente infectados (SUTHERLAND, 1980)

Nas vacas, a multiplicação de *B. abortus* nos placentomas determina necrose, lise das vilosidades e subsequente descolamento do cotilédone e da carúncula. Somente a lesão placentária é suficiente para desencadear o sofrimento fetal por má absorção e oxigenação, que culmina com o abortamento. No entanto, o microrganismo frequentemente invade o feto, determinando infecções em órgãos como pulmão, fígado e baço. Paralelamente, certas fêmeas podem levar a gestação a termo, gerando o nascimento de bezerros doentes e debilitados, que podem vir a óbito em poucos dias. O processo cicatricial e o depósito de fibrina nos placentomas resultam em aderências da placenta nas gestações subsequentes, que se traduzem em altas taxas de retenção de placenta em rebanhos nos quais a doença cursa de forma crônica (ACHA; SZYFRES, 2003). Ademais, as fêmeas bovinas acometidas podem apresentar quadros de metrite, subfertilidade e ou infertilidade, enquanto os plantéis possuem histórico de deficiências nos indicadores reprodutivos (BATHKE, 1988; ACHA; SZYFRES, 2003).

Após o abortamento a bactéria migra para outros órgãos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, podendo determinar mastite crônica ou manter-se quiescente nos linfonodos

mamários até a gestação subsequente (GRASSO PAULIN, 2000). Os animais infectados eliminam a bactéria em grandes quantidades pelos produtos do abortamento, no parto ou pela secreção vaginal durante todo o puerpério, contaminando o ambiente e propiciando a infecção de novos suscetíveis. A eliminação do agente pelo leite é intermitente e pode persistir por vários meses (ACHA; SZYFRES, 2003).

## 2.4 Diagnóstico

A localização preferencial da bactéria nas glândulas acessórias e testículos nos machos bovinos pode induzir, curiosamente, a presença de baixos títulos ou mesmo a ausência de títulos séricos de Ig em touros infectados, dificultando o diagnóstico da brucelose nos machos bovinos com base em métodos sorológicos convencionais (AGUIAR et al., 2001; RADOSTITS et al., 2007). CASAS OLASCOAGA (1976) afirmou que machos bovinos acometidos por *B. abortus* podem reagir à infecção, mostrando baixos títulos de Ig séricas. VASCONCELLOS et al. (1987), no Brasil, e RADOSTITS et al. (2007), nos EUA, referiram a possibilidade de ausência de aglutininas séricas anti-*Brucella abortus* em provas convencionais de soroaglutinação em touros infectados, apesar da presença do microrganismo no sêmen e glândulas acessórias. Na vigência

de baixos títulos de aglutininas séricas em touros nas provas sorológicas de triagem, recomenda-se a confirmação sorodiagnóstica por testes como 2-ME ou FC. Em touros com baixos títulos ou ausência de aglutininas séricas anti-*B. abortus*, o diagnóstico pode ser confirmado pela técnica de sêmen plasma aglutinação (SPA), que se fundamenta na detecção de IgG e IgA no sêmen, (CASAS OLASCOAGA, 1976; SUTHERLAND, 1980; VASCONCELLOS et al., 1987; GRASSO; CARDOSO, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

O isolamento microbiológico de *B. abortus* do sêmen também tem sido preconizado na confirmação da brucelose em touros, com intuito de contornar as limitações dos testes sorológicos nos machos bovinos (BATHKE, 1988; NIELSEN, 1995).

Atualmente, tem-se mostrado promissor o uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), no diagnóstico de fragmentos específicos do DNA bacteriano de *B. abortus* em espécimes de sêmen bovino (MIYASHIRO, 2004).

O isolamento de *B. abortus* dos fetos abortados, da placenta e do leite é considerado o método mais fidedigno no diagnóstico individual da brucelose (SANDOVAL et al., 1979). No entanto, a dificuldade de isolamento do microrganismo e a restrição do diagnóstico

dos rebanhos dificultam o uso do diagnóstico microbiológico como método de controle massal da doença (VASCONCELLOS et al., 1987). Neste contexto, devido às limitações dos métodos laboratoriais fundamentados no cultivo microbiológico do gênero *Brucella*, o diagnóstico da brucelose bovina tem sido fundamentado nas últimas décadas na investigação de Ig anti-*B. abortus* no soro sanguíneo, leite e sêmen (CASAS OLASCOAGA, 1976; NIELSEN; DUNCAN, 1990). Em anos recentes, o uso de técnicas moleculares tem-se mostrado promissor, particularmente no diagnóstico do microrganismo em abortamentos, a partir do sêmen, leite e derivados (MIYASHIRO, 2004).

Paralelamente a persistência de Ig séricas pós-vacinais e a ocorrência de reações inespecíficas nos métodos sorológicos convencionais têm-se constituído no principal entrave no sorodiagnóstico da doença em bovinos. Dentre estas reações inespecíficas incluem-se as reações cruzadas entre as linhagens lisas (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*) ou com outros microrganismos Gram-negativos, quais sejam dos gêneros *Pasteurella*, *Francisella*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Yersinia* (0:9) [LÁZARO; HOFER, 1996; MOLNÁR et al., 1997].

Tanto nos machos quanto nas fêmeas bovinas, a infecção natural por *B. abortus* estimula o aparecimento quase simultâneo de Ig das classes IgM e IgG. Durante a evolução da doença, ocorre declínio e tendência do desaparecimento dos níveis de IgM, enquanto IgG persiste em níveis elevados. O desaparecimento de IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção (CASAS OLASCOAGA, 1976).

O diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos no Brasil foi modificado pela Instrução Normativa nº 2, de 10 de janeiro de 2001, do MAPA, com a deflagração do PNCEBT (BRASIL, 2009). O Programa preconiza as provas do AAT, 2-ME e FC para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina e bubalina. O AAT é recomendado como método de rotina (triagem), enquanto o 2-ME e FC como provas confirmatórias, enquanto para o trânsito e comércio internacional de animais é preconizada somente a FC (BRASIL, 2009).

Após a deflagração do PNCEBT no Brasil, a prova do AAT tem sido utilizada como método de rotina, em substituição à prova clássica de soroaglutinação rápida em placa, em virtude da boa sensibilidade e especificidade do AAT, apesar da detecção preferencialmente da classe IgG nesta prova, fato que limita a identificação (falso negativo) de animais no início de infecção (BRASIL, 2009). Na prova do AAT, a

presença de qualquer reação de aglutinação classifica o animal como reagente. A critério do médico veterinário, os animais reagentes no AAT poderão ser destinados ao abate sanitário ou submetidos às provas confirmatórias do 2-ME ou FC. A prova do AAT é constituída por antígeno a 8%, realizada em placa de vidro, com leitura em quatro minutos de reação. A acidificação do antígeno a pH 3,65 limita a aglutinação da classe IgM, ao contrário da IgG que mantém a capacidade aglutinante neste pH baixo (SHUTHERLAND, 1980; WRIGHT; NIELSEN,1990).

A prova de 2-ME possui boa sensibilidade e alta especificidade, e se caracteriza pela detecção de IgG, considerada a principal classe de Ig presente em animais infectados por *B. abortus*. A reação de 2-ME é realizada em tubos mantidos em estufa, com antígeno em concentração de 0,045% e leitura com 48 horas. O composto 2-ME rompe as pontes dissulfídicas (enxofre) dos pentâmeros de IgM, resultando em monômeros de IgM que perdem a capacidade aglutinante, priorizando assim as reações com IgG, que mantém-se inalterada na presença do radical mercaptoetanol (SHUTHERLAND, 1980; WRIGHT; NIELSEN,1990).

A prova de fixação de complemento fundamenta-se na habilidade do complexo antígeno-anticorpo em ativar o sistema complemento. Esta prova apresenta boa

sensibilidade, alta especificidade e detecta preferencialmente IgG, principalmente da sub-classe IgG<sub>1</sub>, que predomina em animais infectados (WRIGHT; NIELSEN,1990; GRASSO; CARDOSO, 1998). A prova de FC é realizada em placas em “U” com 96 poços, com leitura em uma hora. O método é mais laborioso se comparado a AAT e 2-ME. Desta forma, é realizado em número restrito de laboratórios, visto que exige controle rígido de todos os reagentes (antígeno, sistema hemolítico) [PAULIN, 2003]. A técnica detecta precocemente IgG<sub>1</sub> no soro, em torno do 14<sup>o</sup> dia, e também é capaz de revelar casos crônicos nos quais os níveis de IgM praticamente desapareceram e os níveis de IgG<sub>1</sub> estão baixos, devido ao baixo limiar de detecção da prova (KRUIZE, 1975; PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

Na prova de sêmen plasma aglutinação (SPA), trata-se o sêmen com azida sódica 1%. Em seguida, o material é centrifugado e o plasma seminal é retirado e submetido às provas usuais de aglutinação (AAT, 2-ME) em substituição ao soro sanguíneo (MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1991). Nos animais sêmen plasma positivos há fortes indícios da doença. Como se trata de prova individual, a possibilidade de reações falso-negativas e falso-positivas não deve ser descartada. Desta forma, recomenda-se utilizar a SPA simultaneamente ao sorodiagnóstico convencional (PAULIN,

2003). A técnica de SPA se fundamenta na detecção de IgG e IgA no sêmen, originados da reação inflamatória testicular frente ao microrganismo, mesmo em touros com baixos títulos ou ausência de títulos séricos nas provas sorodiagnósticas convencionais (CASAS OLASCOAGA, 1976; SUTHERLAND, 1980; VASCONCELLOS et al., 1987; GRASSO; CARDOSO, 1998; RADOSTITIS et al., 2007).

No Brasil, AGUIAR et al. (2001) avaliaram a ocorrência de aglutininas anti-*B. abortus* pelas provas de soroglutinação rápida (SAR), AAT, 2-ME e SPA associado ao exame andrológico em 191 touros. Os autores observaram baixos títulos na SAR e ausência de animais reagentes no AAT, 2-ME e SPA, sem relação com animais inaptos à reprodução pelo exame andrológico e presença de títulos nas provas sorológicas. Na microrregião de Goiânia, CAMPOS et al. (2003) examinaram 139 reprodutores bovinos pela prova de soroglutinação rápida, observando dois animais suspeitos que foram não reagentes na prova do AAT, apesar do histórico de abortamento em 32 (53,33%) das 60 propriedades amostradas.

O diagnóstico bacteriológico de *B. abortus* pode ser executado a partir do cultivo do sêmen em meios convencionais ou seletivos para brucela. Após o isolamento, faz-se necessária a classificação das espécies utilizando provas bioquímicas,

particularmente pela utilização de fucsina e tionina (BATHKE, 1988; NIELSEN, 1995). Em meio sólido e condições ideais, após três a sete dias é possível a visualização das colônias, embora se recomende a incubação por no mínimo três semanas (QUINN et al., 2005). As colônias são pequenas, translúcidas, brilhantes, convexas, de bordos arredondados e bem definidos e, geralmente, de coloração leitosa no ágar sangue ovino (5%) ou ágar brucela (BATHKE, 1988). Classicamente as brucelas são recanhecidas como cocobacilos curtos, pequenos e pleomórficos. São Gram negativas e coram-se pelos métodos de Koster e Ziehl-Neelsen modificado (TIMONEY et al., 1988; QUINN et al., 2005). À microscopia óptica comum, apresentam-se isoladas, aos pares ou em pequenos grupos (METCALF, 1994).

Nas últimas décadas, tem sido preconizada a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Este método de diagnóstico detecta fragmento específico do DNA bacteriano, ainda que o microrganismo não esteja viável no espécime clínico analisado (MIYASHIRO, 2004).

A amplificação "in vitro" dos ácidos nucleicos (PCR) permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. Assim, a PCR tem motivado o desenvolvimento de ampla variedade de sistemas baseados na detecção

de ácidos nucleicos de bactérias, vírus e outros microrganismos, bem como de alterações genéticas. Devido à alta sensibilidade, especificidade e rapidez, o método oferece vantagens sobre os testes convencionais de diagnóstico, visto que está baseado na amplificação específica de fragmento de ácido nucléico, compreendido entre dois oligonucleotídeos sintéticos complementares (primers), a cada uma das duas fitas de DNA a ser amplificada (SILVA, 2011).

O emprego da PCR tem sido investigado nos últimos anos no diagnóstico de bactérias e vírus no sêmen, e possibilita a detecção rápida, acurada e, sobretudo, com altas taxas de sensibilidade e especificidade (MIYASHIRO, 2004; SILVA, 2011).

O exame andrológico é a técnica mais difundida em todo mundo para avaliar a qualidade do sêmen de touros (HAFEZ, 1995). Touros com brucelose desenvolvem degeneração testicular, orquite, epididimite e vesiculite seminal. O exame andrológico de touros brucélicos acusa aumento do número de espermatozoides imaturos e/ou anormais, ejaculado fino ou aquoso (devido a redução na concentração espermática), azoospermia, necrospermia, contaminação por exsudato inflamatório purulento com presença de células gigantes, eritrócitos, leucócitos e conteúdo de frutose reduzido (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

## 2.5 Controle

A capacidade de sobrevivência das brucelas em condições naturais é elevada se comparada a outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambientes úmidos, ao abrigo da luz solar direta, pH próximo ao neutro, na presença de matéria orgânica ou nos líquidos placentários e uterinos após abortamento. A bactéria pode permanecer viável por até seis meses em pastos nos quais ocorreram casos de abortamento (USDA, 2009; BRASIL, 2009).

Em geral, a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento, o corte baixo dos pastos e a não utilização do local (no mínimo seis meses) são ações recomendadas no controle da doença em criatórios com diagnóstico de animais positivos (BRASIL, 2009; USDA, 2009).

Em todo o mundo, os países que alcançaram “status” de controle ou erradicação da brucelose, fundamentaram seus programas na adoção de medidas semelhantes às preconizadas pelo Brasil no PNCEBT, particularmente pela vacinação sistemática das bezerras, adoção de quarentena e medidas higiênico-sanitárias nos rebanhos, realização de diagnóstico sorológico continuado nos plantéis, aliado ao abate sanitário dos animais reagentes (GRASSO; CARDOSO, 1998; BRASIL, 2009).

## 2.6 Tratamento

De maneira similar às demais espécies de animais de produção e de companhia, não se recomenda a terapia da brucelose em touros. Tal conduta é justificada pela permanência intracelular de *B. abortus* em fagócitos e a dificuldade de obtenção de níveis terapêuticos dos antimicrobianos no sistema genital masculino, particularmente na vesícula seminal e glândulas acessórias, justificando, em parte, a baixa efetividade da terapia antimicrobiana convencional nesta categoria animal. Apesar da não recomendação da terapia, estão descritos na literatura ensaios terapêuticos experimentais na brucelose em bovinos de alto valor zootécnico, sob estrito controle e responsabilidade médico-veterinária (CORRÊA; CORRÊA, 1992). Contudo, estes ensaios foram conduzidos em situações controladas, com pequeno número de animais e não mostraram efetividade que justificasse a manutenção dos animais no plantel, ou mesmo os riscos para os humanos no manejo dos animais tratados, permanecendo a recomendação de eutanásia de bovinos acometidos, conforme preconiza o PNCEBT (BRASIL, 2009).

## 2.7 Implicações em saúde pública

A brucelose é considerada doença ocupacional em humanos. O advento da pasteurização do leite representou redução significativa no impacto da doença em saúde pública. Porém, nos países emergentes (em desenvolvimento), a brucelose ainda permanece como doença preocupante para os profissionais da área da saúde (ACHA; SZYFRES, 2003).

As infecções pelo gênero *Brucella* em humanos possuem forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com certo contato ou exposição aos animais, quais sejam médicos veterinários, zootecnistas, magarefes, criadores e laboratoristas (USDA, 2009).

*Brucella melitensis* (*B. melitensis*) é reconhecida como a espécie mais patogênica para humanos, seguida por *Brucella suis* (*B. suis*), *B. abortus* e *Brucella canis* (*B. canis*). No entanto, a maioria das infecções em humanos é causada por *B. abortus*, visto que esta é a brucela mais difundida em animais de produção (ACHA; SZYFRES, 2003).

A doença em humanos por *B. abortus* se manifesta geralmente por sinais de febre intermitente, cefaleia, dor muscular e nas articulações. Em geral, as manifestações clínicas por *B. abortus* são mais brandas que as observadas nas

infecções por *B. melitensis* ou *B. suis* (ACHA; SZYFRES, 2003; PAULIN, 2006).

No Brasil, há poucas descrições de isolamento do microrganismo em humanos, embora os registros disponíveis em investigações sorológicas sugiram altos níveis de exposição para os grupos de risco ou de vulnerabilidade, relacionados à ocupação profissional (HOMEM et al., 2000).

Nos humanos, a infecção pelo gênero *Brucella* pode ser provocada pelo contato direto com secreções de animais domésticos (sangue, sêmen, líquido sinovial), fetos, placentas, secundinas, linfonodos e abscessos em articulações, bem como pelo consumo de leite e derivados (PAULIN, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

O leite ingerido “in natura” ou sob a forma de derivados, sem pasteurização prévia, pode veicular o microrganismo para os humanos (USDA, 2009). BOTELHO et al. (1990) assinalaram alta ocorrência da infecção em humanos pela ingestão de leite e subprodutos “in natura” de vacas. MIYASHIRO (2004) utilizando técnicas moleculares detectou a presença de DNA do gênero *Brucella* em derivados de leite bovino comercializados de forma clandestina. Neste estudo, o microrganismo foi identificado em 29 dentre 141 (20,56%) queijos tipo minas frescal e oito dentre 51 (15,68%) queijos minas meia cura.

O alto risco da infecção por *B. abortus* em humanos, a partir dos bovinos, tem sido frequentemente referido na literatura especializada, particularmente em indivíduos que possuem contato estreito com animais (TAYLOR; PERDUE, 1989; ACHA; SZYFRES, 2003). LACERDA et al. (1997) encontraram 11,8% de indivíduos sororreagentes em 59 trabalhadores de abatedouro, reforçando o comportamento ocupacional da doença.

Nos países de clima tropical onde a brucelose grassa de forma endêmica, a transmissão de *B. abortus* dos bovinos para humanos é considerada preocupante para os profissionais da área da saúde (ACHA; SZYFRES, 2003; PAULIN, 2006).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das dificuldades descritas em relação ao diagnóstico da brucelose em touros e da prevalência da doença no Brasil, cabe ao profissional do agronegócio instruir os criadores, tratadores, e trabalhadores rurais às medidas de controle e profilaxia desta doença para que tais problemas sejam sanados.

Medidas que possam levar, inclusive, os criatórios a certificação de propriedades monitoradas e livres de brucelose, agregando valor ao rebanho bovino e seus produtos (carne, leite e derivados).

## REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed.

Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p.28-56.

AGUIAR, D.M.; RIBEIRO, M.G.; BRITO, A.F.; PESSOA, V.M. Soroaglutinação, sêmen plasma aglutinação e exame andrológico no diagnóstico da brucelose em machos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p.103-105, 2001.

BAILY, G.G.; KRAHN, J.B.; DRASAR, B.W.; STOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.4, p.271-275, 1992.

BARBOSA, R.T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M.A.C.M. A importância do exame andrológico em bovinos. **Circular Técnica**. São Carlos, SP, p.1-13, 2005.

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

BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock**. Austin: Texas A&M University Press College Station, 1994. p.1053-1066.

BOTELHO, A.P.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; SANTOS FILHO, A.S.; COELHO, R.M.S.; LIMA, E.T. Recuperação de *Brucella abortus* do leite 'in natura' procedente de vacas soropositivas dos municípios de Pedra e Venturosa-PE: aspectos de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.14, p.72-77, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2009.

CAMPOS, A.C.P.; FRENEAU, G.E.; ACYPRESTE, C.S.; DIAS FILHO, F.C.; BUENO, V.F.F.; SOUZA, J.P.; RESENDE, L.C. Brucelose bovina: prevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* em reprodutores bovinos na microrregião de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, n.2, p.125-129, 2003.

CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, v.18, p.107-141, 1976.

CASTRO, A.C.; GONZÁLEZ, R.S.; PRAT, I.M. Brucellosis: uma revision practica. **Acta Bioquímica Clínica Latino Americana**, v.39, p.203-216, 2005.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl.1, p.46-55, 2009.

CORRÊA WM, CORRÊA CNM. **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Madsj, 1992. p. 213-215.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LOBO, 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. **Arquivo**

**Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl.1, p.118-125, 2009.

FERRAZ, I.B.F. Novos métodos de controle e diagnóstico da brucelose bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23,p.504-508, 1999.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Jornal a folha de São Paulo**. Disponível em <http://www.folhaonline.com.br>. Acesso em 02 de setembro de 2000.

GARCIA-CARRILLO, C. **Animal and human brucellosis in the Americas**. Paris: Office International des Epizooties, 1990.

GONZÁLEZ, R.A.; GONZÁLES-REYES, I.; FLORES-GUTIÉRREZ, G.H. Prevalence of *Brucella abortus* antibodies in equines of a tropical region of México. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.302-304, 2006.

GRASSO-PAULIN, L.M.S. **O combate à brucelose bovina**. 2000. 112f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRASSO, L.M.P.S.; CARDOSO, M.V. Brucelose bovina. **Biológico**, v.60, p.71-79, 1998.

GRASSO, L.M.P.S.; CARDOSO, M.V. Brucelose bovina. **Biológico**, v.60, p.71-79, 1998.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 8.ed. São Paulo, 2004, 583p.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole Ltda. p.3-20, 1995.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M.; VEIGA, J.B.; LAU, H.D.; TOURRAND, J.F.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Some zoonosis in the Eastern Amazon. Case of Uruará, Brazil. In: **International Congress On**

**Animal Hygiene**, 10., 2000, Netherlands. *Anais...* Netherlands, 2000. p.204-210.

IBGE. **Censo agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default.shtm>>. Acessado em: 14 fev. 2011.

JOINT FAO/WHO. **Expert commite on brucellosis**. Genebra: World Health Organization, 1986. 132p.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; GUSTAFSSOON, H. The cow in endocrine focus before and after calving. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.217-221, 2004.

KRUZE, M.V. Métodos de diagnóstico em el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.7, n.2, p.52-64, 1975.

LACERDA, L.M.; ALVES, L.M.C.; MATHIAS, L.A.; RODRIGUES, A.L.B.; ALMEIDA, F.M. Brucelose em trabalhadores de matadouros do município de São Luís, MA, 1997. **Higiene Alimentar**, v.14, p.62-65, 1997.

LÁZARO, N.S.; HOFER, E. Cross-reactions between *Yersinia enterocolitica* serotype 9 and *Brucella spp* in bovine and swine sera, in the area of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.39-43, 1996.

LUCERO, N.E.; AYALA, S.M.; ESCOBAR, G.I.; JACOB, N.R. Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. **Epidemiology and Infection**, v.136, p.496-503, 2008.

MACLURE, M.; WILLET, W.C. Misinterpretation and missure of the kappa statistic. **American Journal of Epidemiology**, v.126, p.161,1987.

- MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J.J.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.; PINTO, M.R.A.; RIBEIRO, M.G.; THIEBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTUJI, B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **Veterinary Record**, v.156, p.147-148, 2005.
- METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. Brucellosis. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. **Handbook of zoonoses**. Section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. Brucellosis diagnosis standard laboratory techniques. New Haw: **Central Veterinary Laboratory**, 1991. 52p.
- MIYASHIRO, S. **Presença de DNA de Brucella abortus em subprodutos lácteos clandestinos: diferenciação da origem da cepa vacinal (B19) ou de campo pela reação da polimerase em cadeia (PCR)**.2004. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TURY, E.; SOUZA, J.S. Conceções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, p.157-62, 1997.
- NICOLETTI, P. Brucellosis on bovine reproductive efficiency. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.271-274.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.25-30, 2004.
- \_\_\_\_\_; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.; DAJER, A.; LUNA MASTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. **Veterinary Microbiology**, v.21, p.163-170, 2001.
- \_\_\_\_\_. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.27, p.9-17, 1995.
- \_\_\_\_\_; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.
- \_\_\_\_\_. Developend of Live Brucella Vaccines. In: ADAMS, L.G. **Advances in Brucellosis Research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.251-276.
- OMER, M.K.; SKJERVE, E.; HOLSTAD, G.; WOLDEHIWET, Z.; MACMILLAN, A.P. Prevalence antibodies to *Brucella* spp. In cattle, sheep, goats, horses and camels in the State of Eritrea; influence of husbandry systems. **Epidemiology and Infection**, v.125, p.447-453, 2000.
- PALMER, C.W. Welfare aspects of therioogenology: investigating alternatives to eletroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v.64, p.469-479, 2005.
- PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. Artigo de revisão: brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, p.389-401, 2008.
- 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) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

\_\_\_\_\_. Brucelose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p.239-249, 2003.

\_\_\_\_\_; FERREIRA NETO, J.S. **O combate à brucelose bovina: situação atual**. Jaboticabal: Editora Funep, 2003. 154p.

\_\_\_\_\_; PRADO, G.E.S.; FEDERSONI, I.S.P.; TEIXEIRA, A.C.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo dos testes 2-mercaptoetanol e reação de fixação do complemento no sorodiagnóstico da brucelose bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p.41-47, 2002.

PLANT, J.W.; CLAXTON, P.D.; JAKOVLJEVIC, D.; DE SARAM, W. Brucella abortus infection in the bull. **Australian Veterinary Journal**, v.52, p.17-20, 1976.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, p.261-267, 2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. 2156p.

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; ALMEIDA, C.A.S. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.83-92, 2008.

SANDOVAL, L.A.; ARRUDA, N.M.; TERUYA, J.M.; GIORGI, W.; AMARAL, L.B.S.; MAZANTI, M.T. Pesquisa em bubalinos: prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo. **Biológico**, v.45, p.209-212, 1979.

SÃO PAULO. **Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. Produto interno bruto do Estado de São Paulo**.

São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/pib/ind ex.php>>. Acessado em: 14 fev. 2011.

SÃO PAULO. **Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral**. Instituto de Economia Agrícola. Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008. São Paulo: SAA/CATI/IEA, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 24/11/2010.

SILVA, N. Detecção de patógenos no sêmen. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.2, p.28-30, 2011.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA NETO, J.S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl.1, p.103-108, 2009.

SUTHERLAND, S.S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bull**, v.50, p.359-368, 1980.

TAYLOR, J.P.; PERDUE, J.N. The changing epidemiology of human brucellosis in Texas, 1977-1986. **American Journal of Epidemiology**, v.130, p.160-165, 1989.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates. Division of Cornell University Press, 1988. p.135-144.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995, 475p.

WRIGHT, P.; NIELSEN, K. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. **Advances in brucellosis research**. Texas: A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.

UNITED STATES. Department of Agriculture. National Center for Animal Health Programs. **Brucellosis facts about brucellosis**. Disponível em: <<http://www.aphis.usda.gov>>. Acesso em: 10 ago. 2009.

VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; CÔRTEZ, J.A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v.11, p.25-36, 1987.