

# Avaliação da persistência de anticorpos vacinais em bezerras bubalinas vacinadas com a cepa B19 de *Brucella abortus*

## Introdução

A Brucelose em bovídeos é uma doença infectocontagiosa, de curso crônico, causada pela bactéria *Brucella abortus*, amplamente distribuída no Brasil, causadora de grandes prejuízos à pecuária nacional e também à saúde pública, por ser uma zoonose. A doença é caracterizada por causar abortos em bovinos e bubalinos, por volta do sétimo mês de gestação, quase sempre com retenção de placenta, além da queda na produção de leite e aumento do número de células somáticas, além da diminuição da performance reprodutiva de vacas infectadas (NETA et al., 2010). Os abortos são frequentes em primíparas, no entanto, nas gestações subsequentes são comuns os nascimentos de natimortos e/ou de bezerros não viáveis (LAGE et al., 2006).

Tendo em vista a grande importância econômica e social da brucelose no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu no ano de 2001 o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT), objetivando estabelecer diretrizes para a diminuição do impacto negativo da brucelose e tuberculose animal. As estratégias preconizadas pelo programa envolvem a vacinação obrigatória de fêmeas bovinas e bubalinas como idade entre 3 a 8 meses, padronização de técnicas diagnósticas, eliminação de animais reagentes, maior envolvimento das Agências de Defesa Sanitária Estaduais, assim como de Médicos Veterinários do setor privado, certificação de propriedades livres destas doenças (LAGE et al., 2006).

O PNCEBT determinou que todas as bezerras bovinas e bubalinas devem ser vacinadas entre três e oito meses de idade, sob a responsabilidade de Médicos-veterinários cadastrados nas Agências de Defesa Sanitária Estaduais. Para a realização das provas diagnósticas para brucelose, Médicos-veterinários devem ser aprovados em curso de treinamento em métodos de diagnósticos e controle de brucelose e tuberculose. O PNCEBT reconhece como provas diagnósticas oficiais os seguintes testes (LAGE et al., 2006):

- Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), teste de triagem, podendo ser realizado por Médicos-veterinários credenciados, laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;
- Teste 2-Mercaptoetanol (2-ME), teste confirmatório em animais reagentes ao AAT, realizado por laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;
- Teste de Fixação de Complemento (FC), teste confirmatório e para trânsito internacional, somente realizado por laboratórios oficiais credenciados;
- Teste do Anel do Leite, utilizado para vigilância epidemiológica, podendo ser executado por Médicos-veterinários credenciados, laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;

Porto Velho, RO  
Dezembro, 2016

### Autores

**Fabio da Silva Barbieri**  
Médico Veterinário, D.Sc.  
em Ciências Veterinárias,  
pesquisador da Embrapa  
Rondônia, Porto Velho,  
RO, fabio.barbieri@embrapa.br

**Luciana Gatto Brito**  
Médica Veterinária, D.Sc.  
em Ciências Veterinárias,  
pesquisadora da Embrapa  
Rondônia, Porto Velho,  
RO, luciana.gatto@embrapa.br

**Paulo Martins Soares Filho**  
Médico Veterinário,  
M.Sc em Medicina  
Veterinária, Fiscal Federal  
Agropecuário, Laboratório  
Nacional Agropecuário  
de Minas Gerais, Pedro  
Leopoldo, MG, paulo.  
soares@agricultura.gov.br

**Raquel Soares Juliano**  
Médica Veterinária, D.Sc.  
em Sanidade Animal,  
pesquisadora da Embrapa  
Pantanal, Corumbá, MS,  
raquel.juliano@embrapa.br

**Aiesca Oliveira Pellegrin**  
Médica Veterinária, D.Sc.  
em Ciência Animal,  
pesquisadora da Embrapa  
Pantanal, Corumbá, MS,  
aiesca.pellegrin@embrapa.br

**Cícero Mendes da Costa**  
Técnico, supervisor 1  
da Embrapa Rondônia,  
Presidente Médici, RO,  
cicero.mendes@embrapa.br

- Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), teste de triagem, podendo ser realizado por Médicos-veterinários credenciados, laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;
- Teste 2-Mercaptoetanol (2-ME), teste confirmatório em animais reagentes ao AAT, realizado por laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;
- Teste de Fixação de Complemento (FC), teste confirmatório e para trânsito internacional, somente realizado por laboratórios oficiais credenciados;
- Teste do Anel do Leite, utilizado para vigilância epidemiológica, podendo ser executado por Médicos-veterinários credenciados, laboratórios credenciados e laboratórios oficiais credenciados;

A certificação de propriedade como livre de Brucelose e Tuberculose deve obedecer ao processo de saneamento, onde é necessária a avaliação de todos os animais da propriedade por meio das provas diagnósticas oficiais. As provas iniciais devem ser repetidas por três vezes sem a ocorrência de animais reagentes, dentro de um período mínimo de nove meses. Após a certificação do rebanho como livre de Brucelose e Tuberculose, os testes diagnósticos devem ser realizados anualmente para renovação da certificação.

## Rebanho Bubalino da Embrapa Rondônia

No campo experimental de Presidente Médici encontra-se estabelecido o rebanho bubalino experimental da Embrapa Rondônia. O rebanho vem sendo selecionado para produção leiteira por meio do aporte de reprodutores da raça Murrah possuindo cerca de 80 animais, entre vacas, novilhas, bezerras e um touro. A reprodução é feita por monta natural e inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Os bezerras machos são descartados com idade em torno de 1 ano com peso vivo médio de 300 kg. Os piquetes são formados por capim-Marandú e cercados com cerca elétrica, sendo a área de divisa com a propriedade vizinha constituída por área ainda florestada, o que impede o trânsito de animais, promovendo um total isolamento do rebanho de outros animais de produção. Os animais em lactação são mantidos a pasto recebendo suplementação volumosa (capim-Cameroun e cana de açúcar triturados) e concentrado (milho e soja) no cocho entre os meses de maio e agosto.

O rebanho bubalino da Embrapa Rondônia vem sendo monitorado para detecção de animais reagentes para brucelose e tuberculose desde o ano 2002, sendo preconizadas medidas preventivas para a promoção e a manutenção do *status* sanitário de propriedade livre de Brucelose e Tuberculose por meio da vacinação das bezerras contra brucelose e eliminação de animais reagentes. Em 2010, após o processo de saneamento do rebanho de acordo com o preconizado pelo PNCEBT, o campo experimental de Presidente Médici recebeu o certificado de propriedade livre de brucelose e tuberculose, emitido pelo MAPA.

Durante as avaliações para renovação da certificação nos anos seguintes, alguns animais foram reagentes nas provas diagnósticas para brucelose, promovendo discussões com relação aos resultados dos testes em um rebanho fechado e monitorado a mais de oito anos, sem a ocorrência de abortos e nascimentos de natimortos ou bezerras fracas. Um dos questionamentos foi que a reação poderia ter sido causada em virtude de persistência de anticorpos vacinais, apesar das bezerras bubalinas terem sido vacinadas dentro do prazo estabelecido pelo PNCEBT. Para elucidar tal situação, durante 21 meses se realizou o monitoramento da persistência de anticorpos vacinais para Brucelose em 12 bezerras bubalinas, as quais foram vacinadas aos seis meses de idade e acompanhadas mensalmente por meio da coleta de soro e execução das provas diagnósticas oficiais. Este trabalho foi realizado em parceria com o Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, localizado em Pedro Leopoldo, MG (LANAGRO/ MG) e a Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON).

## Monitoramento de bezerras bubalinas

O monitoramento foi conduzido no rebanho bubalino da Embrapa Rondônia, o qual manteve-se certificado como livre de brucelose e tuberculose, sendo esta uma condição necessária para a execução do estudo. Foram monitoradas 12 bezerras bubalinas nascidas entre janeiro e julho de 2012, sendo colhido amostras de sangue para obtenção de soro antes do procedimento vacinal para brucelose utilizando a cepa vacinal B19. Todas as bezerras foram vacinadas aos seis meses de idade, sendo a vacina adquirida em lojas agropecuárias, no Município de Presidente Médici, RO. A partir da coleta e vacinação (Mês

0-MO), mensalmente foram realizadas colheitas de sangue para obtenção do soro até o 27º mês de idade (mês 21).

Todas as colheitas de sangue foram feitas por meio de punção da veia jugular, utilizando-se frascos tipo-Vacumtainer, os quais foram deixados inclinados e sob refrigeração por 24 horas, e posteriormente, centrifugados para a obtenção do soro. As alíquotas de soro foram acondicionadas em

tubos tipo-Eppendorff, devidamente identificados, e armazenados em freezer à -20°C. Posteriormente, as amostras de soro foram encaminhadas sob refrigeração ao LANAGRO/ MG, para a realização das seguintes provas diagnósticas oficiais: (1) Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e (2) 2-Mercaptoetanol (2-ME), realizadas de acordo com o protocolo proposto pelo PNCEBT (LAGE et al., 2006).



**Figura 1.** Lote de bezerras bubalinas da raça Murrah com média de seis meses de idade pertencentes ao rebanho do campo experimental de Presidente Médici (CEPM) da Embrapa Rondônia.

Os resultados obtidos nas provas diagnósticas oficiais realizadas no LANAGRO estão nas Tabelas 1 e 2, para o AAT e 2-ME, respectivamente. Foi calculada a porcentagem de fêmeas reagentes (+) e não reagentes (-) em cada mês de avaliação (Tabela 3). Comparando os resultados descritos nas Tabelas 1 e 2, pode ser observado melhor especificidade na prova 2-ME, já esperado por causa da natureza da prova ser confirmatória.

No mês 0, ou seja, antes da vacina contra brucelose, não houve reação em 58,3% das fêmeas bubalinas avaliadas para a prova de triagem (AAT) (Tabela 3), onde todas foram não reagentes para prova confirmatória (2ME) (Tabela 2). A fêmea de n.º. 04 apresentou persistência de anticorpos vacinais durante todos os meses de avaliação. Ainda, quatro

fêmeas (n.º. 05, 08, 09 e 10), apesar de terem apresentado resultados negativos durante o período de monitoramento de anticorpos, reagiram novamente ao teste do AAT, as quais, pelas normas do PNCEBT podem ser submetidas a prova confirmatória. No teste confirmatório 2-ME, duas fêmeas (n.º. 10 e 12) não demonstraram reação a partir do M3, e em 91,7% das fêmeas avaliadas (Tabela 3) não foi possível a detecção de anticorpos vacinais já no M9, quando as fêmeas vacinadas atingiram os 15 meses de idade. Somente uma das fêmeas acompanhadas (n.º. 08) apresentou nova detecção de anticorpos vacinais pelo teste do 2-ME após resultados negativos (Tabela 2). Animais que apresentam tal perfil imunológico são animais atípicos e podem ser considerados *outliers*.

Bezerras/ coletas (mês)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
67	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
78	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
89	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
90	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 1.** Resultados obtidos para as fêmeas bubalinas submetidas a prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT): fêmeas não reagentes (-) e fêmeas reagentes (+).

Bezerras/ coletas (mês)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
67	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
88	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2.** Resultados obtidos para as fêmeas bubalinas submetidas a prova do 2-Mercaptoetanol (2-ME): fêmeas não reagentes (-) e fêmeas reagentes (+).

Coletas (mês)	AAT		2-ME	
	Não Reagente	Reagente	Não Reagente	Reagente
0	58,3	41,7	100	0
1	0	100	0	100
2	0	100	0	100
3	0	100	16,7	83,3
4	0	100	33,3	66,7
5	16,7	83,3	58,3	41,7
6	41,7	58,3	75	25
7	41,7	58,3	83,3	16,7
8	75	25	83,3	16,7
9	75	25	91,7	8,33
10	75	25	91,7	8,33
11	75	25	83,3	16,7
12	83,3	16,7	83,3	16,7
13	83,3	16,7	91,7	8,33
14	91,7	8,33	91,7	8,33
15	75	25	91,7	8,33
16	75	25	91,7	8,33
17	75	25	83,3	16,7
18	83,3	16,7	91,7	8,33
19	83,3	16,7	83,3	16,7
20	58,3	41,7	91,7	8,33
21	75	25	100	0

**Tabela 3.** Porcentagem de fêmeas bubalinas não reagentes e reagentes durante o monitoramento de anticorpos vacinais por meio da realização das provas imunológicas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME).

A partir dos resultados obtidos foi possível preconizar como extremamente recomendável a realização da prova confirmatória para o diagnóstico da brucelose (2-ME) em casos de resultados positivos no teste de triagem (AAT) para os rebanhos bubalinos que: não possuem histórico recente de aborto no último trimestre gestacional, principalmente, em vacas primíparas; onde não houve a introdução de animais no rebanho; que realizam a vacinação das bezerras conforme a recomendação do PNCEBT e que são monitorados anualmente para brucelose por meio da realização de provas diagnósticas oficiais. Tal procedimento evitará o sacrifício de animais falso-positivos, preservando animais de alto valor genético, assim como resguardando o patrimônio econômico da propriedade.

### Protocolo vacinal

O monitoramento da persistência de anticorpos vacinais para brucelose em bezerras bubalinas nos permite observar que somente uma fêmea permaneceu reagente ao teste AAT durante todo o período observacional. Essa mesma fêmea ao ser submetida a prova confirmatória do 2-ME continuou apresentando reação antigênica até o M21, correspondendo a 27 meses de idade. Tal fêmea seria considerada reagente e eliminada do rebanho em caso de exame logo após os 24 meses, como recomendado pelo PNCEBT. Fêmeas reagentes ao AAT, não submetidas ao 2-ME e consideradas como outliers também poderiam ser eliminadas do rebanho caso a prova confirmatória não seja realizada, o que indica que o AAT não deve ser a prova imunológica de eleição para a tomada de decisão na eliminação de bubalinos nos rebanhos testados. As médias de meses para que todas as fêmeas não se mostrassem reagentes na prova de triagem (AAT) e na confirmatória (2-ME), excluindo a fêmea n.º. 04 (exceção), foi de 7,82 e 5,18 meses, respectivamente. Entretanto, houve reação na prova confirmatória até o nono mês e no AAT até o 14.º mês após a vacinação com a cepa B19 de *Brucella*, o que corresponde a 15 e 20 meses de idade dos animais.

O PNCEBT estabelece que todas as fêmeas bovinas e bubalinas devem ser vacinadas entre o terceiro e o oitavo mês de idade, porém, considerando os resultados obtidos durante o acompanhamento das

fêmeas vacinadas, recomenda-se que a vacinação de fêmeas bubalinas ocorra mais precocemente, em torno dos três a quatro meses de idade, evitando que fêmeas bubalinas vacinadas desenvolvam reações falso-positivas que ocorrem em decorrência da persistência de anticorpos vacinais quando submetidas às provas diagnósticas oficiais do PNCEBT, tanto de triagem como a confirmatória do 2-ME.

### Agradecimentos

Os autores deste trabalho agradecem aos funcionários do campo experimental de Presidente Médici, Edson Luiz Batista e Delvino Ferreira de Almeida que auxiliaram nas colheitas durante todo o período de monitoramento dos animais assim como pela dedicação e persistência ao rebanho bubalino da Embrapa Rondônia. Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, LANAGRO MG, pela estreita colaboração que nos permitiu a execução do estudo.

### Referências

- LAGE, A. P.; ROXO, E.; MULLER, E. E.; POESTER, F. P.; CAVALLÉRO, J. C.; FERREIRA NETO, J. S.; MOTA, P. M. P. C.; GONÇALVES, V. S. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília : MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.
- NETA, A.V.C.; MOL, J.P.S.; XAVIER, M.N.; PAIXÃO, T.A.; LAGE, A.P.; SANTOS, R.L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 146–155, 2010.

**Circular  
Técnica, 148**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Rondônia**

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127,  
CEP 76815-800, Porto Velho, RO.

**Fone:** (69)3219-5004

**Telefax:** (69)3222-0409

**www.embrapa.br/rondonia**

**www.embrapa.br/fale-conosco/sac**

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



**1ª edição**

1ª impressão (2016): 100 exemplares

**Comitê  
de Publicações**

**Presidente:** César Augusto Domingues Teixeira

**Secretário:** Henrique Nery Cipriani

**Membros:** Marília Locatelli

Rodrigo Barros Rocha

José Nilton Medeiros Costa

Ana Karina Dias Salman

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Fábio da Silva Barbieri

Wilma Inês de França Araújo

**Expediente**

**Normalização:** Daniela Maciel Pinto

**Revisão de texto:** Wilma Inês de França Araújo

**Editoração eletrônica:** Gamma Editora