

ARTIGO DE REVISÃO
BRUCELOSE EM BÚFALOS

L.M.S. Paulin¹; J.S. Ferreira Neto²

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: paulin@biologico.sp.gov.br

RESUMO

A bubalinocultura é uma atividade econômica relevante no Brasil. Considerando a importância do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose para a evolução das cadeias produtoras de bovinos e bubalinos e tendo em vista a escassez de estudos sobre o sorodiagnóstico da brucelose na espécie bubalina, procedimento no qual apóia-se o processo de certificação de rebanhos livres e monitorados, é apresentada uma revisão sobre brucelose bubalina. Neste trabalho são discutidos os seguintes temas: 1- a bubalinocultura no Brasil; 2- revisão e aspectos históricos da brucelose bovina e bubalina; 3- revisão sobre o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos e bubalinos.

PALAVRAS-CHAVE: *Brucella abortus*, sorodiagnóstico, brucelose, revisão, búfalo, eritritol.

ABSTRACT

BRUCELOSIS IN BUFFALOES. Water buffaloes are currently an important animal for livestock production in Brazil. Considering the importance of the National Program of Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis for the progress of bovine and bubaline production and also due to the few published studies on serological diagnosis of brucellosis in this species, a procedure that supports the process of certification of brucellosis free and monitored herds, a review on bubaline brucellosis is presented, including the following chapters: 1- buffalo in Brazil; 2- review and history of bovine and bubaline brucellosis; 3- review on the serological diagnosis of bovine and bubaline brucellosis.

KEY WORDS: *Brucella abortus*, serological diagnosis, brucellosis, review, buffalo, erythritol.

O BÚFALO NO BRASIL

O búfalo indiano, ou doméstico, pertence ao gênero *Bubalus*, espécie *bubalis*, a qual é dividida em dois grupos principais: o *Bubalus bubalis*, com 50 pares de cromossomos, conhecido como búfalo de rio, e o *Bubalus bubalis* variedade kerebau, denominado búfalo do pântano ou Carabao, com 48 pares de cromossomos. Dentre as 19 raças de búfalos, a Carabao é utilizada para trabalho e produção de carne. As 18 restantes, todas pertencentes à espécie *Bubalus bubalis*, possuem dupla aptidão (produção de carne e leite). Dezesesseis (Murrah, Jafarabadi, Surti, Nagpuri, Mili-Ravi, Kundi, Meshana, Pandharpuri, Manda, Jerangi, Kalahandi, Sambalpur, Bhadawari, Tharai, Toda e South Kanara) são originárias do continente indo-paquistanês, totalizando apenas 20% da população bubalina dessa região, pois a maioria (80%) é constituída por

búfalos sem raça definida ou "Desi". A raça Mediterrânea originou-se da Surti e recebeu esse nome por ter sido levada para o sul da Europa e selecionada para produção leiteira há mais de 2.000 anos. Hoje, a raça é considerada patrimônio italiano. Escavações arqueológicas na Índia encontraram fósseis de búfalos datados de 60.000 anos antes de Cristo (A.C.). Estima-se que o búfalo tenha sido domesticado em torno do ano 3.000 A.C. no Vale de Indus, na Índia; na região de Ur, no Iraque e na China. Do continente asiático foi levado para a África e depois para a Europa, Oceania e, recentemente, para a América (BUBBALIFE, 2006).

Os búfalos são animais dóceis, rústicos, precoces, longevos, produzem tanto leite quanto carne e também são utilizados para trabalho. Atualmente, são criados em várias regiões do mundo, com destaque para Índia, Itália e Brasil (BARUSELLI, 1993; MARQUES; CARDOSO, 1997). Estão presentes em todos os países

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

americanos, à exceção do Chile e Canadá (BUBBALIFE, 2006). Estima-se que a população bubalina da América do Sul seja de cerca de 3.800.000 cabeças, das quais 3.500.000 encontram-se no Brasil, 150.000 na Venezuela, 50.000 na Argentina, 30.000 na Colômbia e o restante distribuída pelos outros países (PAULIN, 2006 b). No Brasil, os búfalos foram importados da Austrália, Egito, Índia, Itália e sudoeste asiático e introduzidos pela Ilha de Marajó, em 1895, onde encontraram condições ótimas para sua adaptação (MARQUES; CARDOSO, 1997).

Os búfalos são pouco seletivos em relação às forrageiras e transformam alimentos, usualmente não consumidos por outros animais do mesmo porte, em proteínas nobres (MARQUES; CARDOSO, 1997). Além disso, podem ser criados em regiões topográficas impróprias para bovinos, tais como várzeas inundáveis do rio Amazonas, baixadas litorâneas como o Vale do Ribeira, SP, Pantanal Mato-grossense e banhados da região Sul (BARUSELLI, 1993; MARQUES; CARDOSO, 1997). Essas características peculiares têm despertado o interesse dos pecuaristas, fazendo com que, na última década, a bubalinocultura crescesse a uma taxa de 12,7% ao ano, ganhando cada vez mais importância econômica, tanto na produção de carne quanto de leite, colocando o Brasil como um dos maiores rebanhos comerciais do mundo (MARQUES; CARDOSO, 1997). O rebanho bubalino brasileiro concentra-se principalmente na região Norte do país (65% do efetivo total), distribuído entre as raças Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (MARQUES; CARDOSO, 1997).

A carne de búfalos contém 40% menos colesterol, 55% menos calorias, 11% mais proteínas e 10% mais minerais que a carne bovina. O leite, com menor teor de colesterol, maior teor de gordura e mais proteínas, quando comparado ao dos bovinos, apresenta maior rendimento para a produção de queijo (particularmente a mussarela) bem como a manteiga (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE apud TONHATI, 1997).

Embora no passado os búfalos tenham sido considerados mais resistentes que os bovinos, hoje, com o avanço dos estudos, verifica-se que essa afirmação era desprovida de base científica. Por serem animais de produção, as doenças zoonóticas que também apresentam impacto negativo na produção possuem especial importância para a espécie. Dentre essas doenças destacam-se a leptospirose e a brucelose, pois causam os mesmos problemas reprodutivos verificados em bovinos, resultando em diminuição da produção de carne e leite. Como a brucelose é uma antropozoonose de grande impacto na produção, ela tornou-se alvo de programas em massa desencadeados por vários países desde o início do século XX e hoje significa uma barreira para o comércio internacional de animais e seus produtos (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZZOTIA, 2006; PAULIN, 2006a).

A BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA

A brucelose é uma antropozoonose infecto-contagiosa de evolução geralmente crônica e caráter granulomatoso difuso, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, provocada por uma bactéria intracelular facultativa pertencente ao gênero *Brucella*. Nos animais compromete, sobretudo, os sistemas reprodutivo e osteo-articular, ocasionando com frequência o abortamento no terço final da gestação. No homem, os sintomas mais frequentes são inespecíficos, comumente observados nos quadros de infecções generalizadas (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

A história da brucelose tem forte associação com a medicina militar. Em 1751, Cleghorn, cirurgião do exército britânico servindo na Ilha de Minorca, Espanha, descreveu casos de uma doença com sinais semelhantes aos citados por Hipócrates no ano 460 A. C. e semelhantes à brucelose (EVANS, 1950). Porém, foi Marston, também cirurgião do exército britânico, em 1859, quem caracterizou a doença como entidade nosológica autônoma, quando contraiu brucelose na Ilha de Malta, situada ao sul da Sicília, Itália, e relatou, pela primeira vez, uma "febre gástrica renitente" como principal sintoma da doença. Considera-se, no entanto, que a brucelose tenha sido oficialmente descrita em 1887 por David Bruce. Bruce isolou a bactéria do baço de um soldado que morrera em consequência da doença que grassava na base naval inglesa da Ilha de Malta, denominada então de "Febre de Malta". Baseando-se nas características coloniais e microscópicas, ele denominou a bactéria como *Micrococcus melitensis*. "*Micrococcus*" porque observou um agente pequeno e curto, e "*melitensis*", em homenagem à ilha. Melita é o nome em latim para Malta que, em grego, língua corrente local, significa "do mel" (PAULIN, 2006b).

Em 1897, Bang e Stribolt, na Dinamarca, isolaram e identificaram uma bactéria intracelular de vacas que abortaram, denominando-a *Bacillus abortus bovis*. O sinal foi reproduzido em novilhas gestantes infectadas experimentalmente e a doença foi chamada de "doença de Bang". Porém, não foi estabelecida qualquer relação entre essa doença e a Febre de Malta. Nesse mesmo ano, Wright e Smith desenvolveram o teste de Wright ou teste soroaglutinação lenta em tubos (SLT) para o sorodiagnóstico da septicemia causada pelo então denominado *Micrococcus melitensis*. Em 1905, Zammit concluiu que o leite oriundo das cabras de Malta era a via de transmissão da brucelose para humanos, fato que levou à proibição do consumo do produto no Reino Unido, em 1906. Após um ano dessa resolução, constatou-se forte redução nas mortes de soldados britânicos (PACHECO; MELLO, 1956). Em 1914, a partir de abortamento suíno,

Traum isolou um tipo de brucela que se distinguia das demais por certas propriedades bioquímicas e antigênicas. O problema já havia sido estudado por Hutyra em 1909, na Hungria. A princípio a bactéria foi chamada de *Bacillus abortus suis* e, posteriormente, de *Brucella suis* (PACHECO; MELLO, 1956).

Em 1918, a médica Alice Evans identificou, pela primeira vez, a brucelose em humanos nos EUA, informando haver relação íntima do *Bacillus abortus* com o *Micrococcus melitensis*, concluindo que as bactérias isoladas de caprinos, bovinos e humanos eram similares e que o *Micrococcus melitensis* era, na verdade, um bacilo, e não um coco como originalmente descrito. Também sugeriu que a doença passasse a se chamar brucelose, em homenagem a Bruce. Dois anos depois, Meyer e Shaw propuseram a criação do gênero *Brucella* (PACHECO; MELLO, 1956).

Em 1957, Stoenner e Lackman isolaram a *B. neotomae* de uma espécie de rato (*Neotoma lepida*) oriundo do deserto de Utah, nos Estados Unidos - EUA (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003). No final da década de 1960, vários investigadores relataram aumento na incidência de abortamento e epididimite em cães nos EUA, com ocorrência de surtos inicialmente em cães da raça Beagle em cães comerciais e cães de zonas rurais (CARMICHAEL, 1966). Uma bactéria, morfológicamente semelhante à brucela, foi isolada de placenta e fetos caninos abortados recebendo o nome de *B. canis* após, inicialmente, ser considerada um biotipo da *B. suis* por compartilhar com ela características bioquímicas. Logo em seguida, a *B. canis* foi isolada em cães das mais diferentes raças, sempre associada a problemas reprodutivos, e sua ocorrência foi relatada em diversos países (NIELSEN; DUNCAN, 1990). Em 1994, Ross *et al.* (Reino Unido) e EWALT *et al.* (EUA) isolaram um novo grupo de brucelas a partir de mamíferos marinhos, o qual foi denominado de *B. maris*. Este grupo possui uma gama de hospedeiros relativamente grande e, devido à ocorrência de um acidente de laboratório, foi considerado como zoonose (BREW *et al.*, 1999). CLOECKAERT *et al.* (2001) verificaram diferenças moleculares entre os isolados e propuseram a sua classificação em duas espécies: a *B. pinnipediae*, correspondente a isolados de pinípedos (focídeos e otariídeos), e a *B. cetaceae* (isolados de cetáceos).

No Brasil, a brucelose bovina é conhecida desde 1914, quando Danton Seixas diagnosticou clinicamente a doença no Rio Grande do Sul. Porém, a primeira investigação baseada em informes epidemiológicos e exames laboratoriais de isolados de fetos abortados foi efetuado por Tinécio Icabaci em 1922, que descreveu um foco de brucelose bovina em São Carlos, SP (BRASIL, 1988).

Atribui-se a Zaki o primeiro isolamento da *B. abortus* em leite de búfala, em 1948. O autor verificou que 15% das amostras de leite de búfala das cercanias

do Município de Cairo estavam infectadas por *B. abortus*, isolada através de cobaios (apud GENTILE, 1957). No Brasil, o primeiro relato de brucelose em búfalos foi efetuado por SANTA ROSA *et al.* (1969), que reportaram 27 de 66 (40,9%) búfalos reatores ao teste soroglutinação rápida em placa - SRP. No entanto, o primeiro isolamento foi estabelecido por OGASSAWARA *et al.* (1969) do conteúdo de um hígroma articular (MATHIAS *et al.*, 1998).

Os prejuízos econômicos provocados pela brucelose em bovinos já estão bem caracterizados e são decorrentes de abortamentos, baixos índices reprodutivos, perda de prestígio das propriedades infectadas, menor valor dos animais e produtos provenientes de áreas acometidas e restrições para mercados potenciais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2006). Atribui-se à brucelose bovina uma diminuição da produção de carne entre 10 e 15%, queda de 10 a 24% na produção leiteira, dilatação do intervalo entre partos de 11,5 para 20 meses, queda de 15% nos nascimentos e sobrevivência dos produtos e aumento na taxa de reposição dos animais em cerca de 30% (PAULIN, 2006a). É provável que ocorram prejuízos semelhantes para a bubalinocultura.

A brucelose no homem é de distribuição mundial. Entretanto, com o advento da pasteurização do leite, houve uma redução do seu impacto em saúde pública. Porém, nos países menos desenvolvidos, muitos casos de brucelose ainda ocorrem pela ingestão de produtos lácteos contaminados (MANUAL MERCK, 2004). Nos EUA, em 1994, os casos humanos de brucelose no Estado da Califórnia foram desencadeados pela ingestão de leite e derivados oriundos do México (USDA, 2006). Hoje, a brucelose humana possui forte caráter ocupacional, afetando profissionais que desenvolvem atividades com maior risco de exposição, tais como tratadores, médicos veterinários, magarefes e laboratoristas (USDA, 2006). A espécie mais infectante e patogênica para humanos é a *B. melitensis*, seguida da *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*. Além dessas, a *B. pinnipediae* e a *B. cetaceae* também foram relacionadas à infecção humana (CORBEL, 1997). Porém, a maioria das infecções humanas é causada pela *B. abortus*, pois esta é a espécie mais difundida nos plantéis animais. Nesse caso, a doença manifesta-se geralmente na forma subclínica e os sinais mais comuns são semelhantes aos observados nos quadros de infecções generalizadas. Os sintomas em geral são mais brandos que os observados nas infecções por *B. melitensis* ou *B. suis* (PAULIN, 2006a). No Brasil, há poucos relatos de isolamento da brucela no homem, porém os registros disponíveis sugerem altos níveis de exposição (HOMEM *et al.*, 2000).

As brucelas apresentam duas morfologias de colônias decorrentes da constituição química da sua parede celular. Por isso, são divididas em dois grupos

antigenicamente distintos: as lisas ou clássicas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e *B. maris*) e as rugosas (*B. ovis* e *B. canis*). A *B. abortus* subdivide-se em oito biovars (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e a estirpe vacinal B19), a *B. melitensis* em três (1, 2 e 3) e a *B. suis* em cinco (1, 2, 3, 4 e 5). O grupo das rugosas não se subdivide (CORBEL, 1997; QUINN *et al.*, 1994). Há reação sorológica cruzada entre brucelas do mesmo grupo, tanto lisas como rugosas.

As brucelas apresentam preferências por determinados hospedeiros. Assim sendo, a *B. abortus* acomete preferencialmente bovídeos, a *B. suis* suídeos, a *B. melitensis* caprinos, a *B. canis* canídeos e a *B. ovis* ovinos. O principal agente para bovinos é a *B. abortus* biotipo 1, presente no mundo todo, sendo o mais prevalente também na América Latina. No Brasil, até 1985, foram confirmados os biotipos 1, 2 e 3 da *B. abortus*, o biotipo 1 da *B. suis*, a *B. ovis* e a *B. canis* (GARCÍA-CARRILLO, 1990). Os búfalos são acometidos pelos mesmos biotipos que os bovinos (BISHOP *et al.*, 1994; MEGID *et al.*, 2005; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1986).

As brucelas possuem um lipopolissacarídeo (LPS) em suas membranas externas, constituído de três partes: um glicofosfolípido denominado lipídio A (LA), que é uma endotoxina responsável pela patologia da doença, um oligossacarídeo central e, em sua porção terminal, apenas no caso das brucelas lisas, a cadeia O (CO), homopolímero formado por cerca de 100 resíduos do monossacarídeo α -D-Rhap4Nfo (CORBEL, 1997). A CO é o sítio imunodominante da bactéria e o responsável pelo desencadeamento da maior parte da resposta imune humoral nas infecções naturais e na desenvolvida após a vacinação com a B19 (SCHURIG, 1997). Quatro epítomos estão ligados à CO: C/Y, C, A e M. Porém, a maioria dos anticorpos é produzida contra o epítomo C/Y e o hapteno NH, este último ligado ao LPS (MORENO *et al.*, 1998). Esses elementos são responsáveis pelas reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas, como a *E. coli* sorogrupo O:157, a *Yersinia enterocolitica* sorogrupo O:9 e a *Salmonella* sorogrupo O:30 (CORBEL, 1985). A CO também se relaciona com a aderência da bactéria às células do hospedeiro, com a capacidade da brucela de manter-se viva dentro dos fagócitos e com a sua proteção contra a ação dos anticorpos e do sistema complemento. Devido a essas particularidades, acredita-se que a CO seja um importante fator de interação parasita-hospedeiro e que sua ausência resulte em perda de virulência (QUINN *et al.*, 1994).

As brucelas penetram no organismo dos mamíferos pelas mucosas do trato digestório, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Em bovídeos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. Do aparelho digestório superior, são carregadas aos linfonodos e fagocitadas principalmente por macrófagos, onde

podem permanecer quiescentes por meses. A bacteremia poderá ocorrer, com as brucelas dentro dos macrófagos ou livres no plasma, alojando-se em tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, tais como baço, fígado, linfonodos (ACHA e SZYFRES, 2001; BATHKE, 1988) e especialmente naqueles onde há maior disponibilidade de elementos que estimulem sua multiplicação. No caso dos bovídeos, destacam-se os produtos da degradação do eritritol, dos hormônios esteróides (a prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) e o estradiol-17 β - E17 β) e de outros progestágenos (QUINN *et al.*, 1994).

O eritritol é um poli álcool composto por quatro carbonos que serve como fonte de energia para as brucelas (MEYER, 1967; SPERRY; ROBERTSON, 1975) e está presente nos tecidos osteoarticulares, mamários e órgãos reprodutores femininos e masculinos, atingindo grandes concentrações no útero gravídico, principalmente nos líquidos fetais, nos placentomas e no tecido córion-alantoideano (KEPPIE *et al.*, 1964). As brucelas não metabolizam diretamente o eritritol, mas a eritrose, açúcar simples resultante do desdobramento da eritrose, subproduto do eritritol. A quebra da eritrose em eritrose é efetuada pela enzima D-eritrose-1-fosfato de-hidrogenase (D-Ery) produzida por todas as brucelas, exceto a estirpe B19. A oferta de eritritol cresce na razão direta da evolução da gestação, porém apresenta alta concentração até os cinco meses da prenhez (SAMARTINO *et al.*, 1996). Essa informação sugere que outras substâncias, além da eritrose, possam estimular multiplicação das brucelas potencializando a sua presença e provocando o abortamento. Essas outras substâncias podem ser os produtos da degradação de hormônios esteróides sobretudo o estradiol, visto que a maior parte dos abortamentos ocorre no terço final da gestação, quando o tecido córion-alantoideano apresenta-se mais desenvolvido e há máxima concentração de E17 β no soro materno (BEDFORD *et al.*, 1972; KINDAHL, 2004).

A PGF₂ α e E17 β são produzidos pelas vilosidades do tecido córion alantoideano, composto principalmente por trofoblastos (SMITH, 1919; SMITH *et al.*, 1961) que, ao final do primeiro trimestre da prenhez, produzem quantidades de PGF₂ α e E17 β suficiente para manter a gestação. Acredita-se que os produtos da degradação desses hormônios sejam utilizados no metabolismo das brucelas, que colonizam e multiplicam-se massivamente nos trofoblastos (MEADOR; DEYOE, 1989; SMITH, 1919; SMITH *et al.*, 1961), culminando no seu rompimento e permitindo que a bactéria acesse diretamente o feto (PAYNE, 1959).

A multiplicação da *B. abortus* no ambiente uterino desencadeia uma reação inflamatória dos placentomas que evolui para necrose, lise das vilosidades e subsequente descolamento do cotilédone e da carúncula. Nos cursos agudos, esse processo

desencadeia o abortamento. Porém quanto menos intensa for a necrose, maior será a deposição de fibrina entre as vilosidades e mais tardio o abortamento, podendo a gestação vir a termo, gerando produtos que sobrevivem por poucos dias. O excesso de deposição de fibrina leva à retenção de placenta. As lesões também diminuem a circulação materno-fetal, comprometendo a respiração e a alimentação do produto, levando-o à morte, que também pode ser causada pelas próprias bactérias, caso estejam em concentração elevada no âmnion. Em ambos os casos, podem surgir fetos macerados e/ou mumificados, sinais mais freqüentes em búfalos do que em bovinos (ACHA; SZYFRES, 2001). O quadro pode evoluir para metrite ou endometrite crônicas, gerando subfertilidade, infertilidade ou esterilidade, em geral com secreção vaginal (ACHA; SZYFRES, 2001; BATHKE, 1988). Cerca de duas semanas após a expulsão do produto, quando o útero entra em repouso e a bactéria migra para outros órgãos ativos, como a glândula mamária e os linfonodos supramamários, pode ocorrer mastite crônica sem lesões aparentes ou mudanças das características do leite (BATHKE, 1988).

A bactéria é eliminada em grandes quantidades pelo animal infectado pelos produtos do abortamento ou parto e 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 persiste por meses (ACHA; SZYFRES, 2001).

A capacidade de sobrevivência da brucela em condições naturais é grande se comparada à de outras bactérias patogênicas não esporuladas, sobretudo em ambiente úmido, ao abrigo da luz solar direta, pH neutro e na presença de matéria orgânica. Em geral, a remoção dos animais e produtos infectados, a eliminação da matéria orgânica, a desinfecção do local do abortamento, a secagem de ambientes úmidos e o vazio sanitário de, no mínimo, dois meses são suficientes para evitar a transmissão para animais suscetíveis (USDA, 2006). Os desinfetantes mais recomendados são os produtos à base de cloro (2,5%), soda cáustica a 2-3%, cal hidratada a 20%, amônia quaternária a 2-3% com tempo mínimo de contato de uma hora. Álcool 70° tem ação imediata. A pasteurização, fervura ou autoclavação inativam as brucelas quando bem realizadas (OMS, 1986). Recomenda-se o corte da pastagem para facilitar a ação bactericida da luz solar direta, que em quatro horas e 30 minutos inativa as brucelas (WRAY, 1975).

Quando a brucela é introduzida em uma população suscetível, num primeiro momento, a maioria das fêmeas infectadas aborta (ACHA; SZYFRES, 2001). Na prenhez subsequente há reinvasão do útero, mas a proporção de abortamentos decresce em 20 a 25%. Raramente o sinal ocorre na terceira prenhez. Passa-

da a fase aguda sobrevém à crônica, quando apenas os animais suscetíveis introduzidos no rebanho ou novilhas de primeira cria abortam (ACHA; SZYFRES, 2001; BISHOP *et al.*, 1994).

Entre os ruminantes, a maioria das infecções ocorre pela ingestão de pastagens, alimentos e águas contaminadas, mas também pelo contato direto com o animal infectado ou sêmen contaminado (ACHA; SZYFRES, 2001). Porém, a transmissão vertical também ocorre (OMS, 1986), podendo desencadear a condição de "portador latente", fenômeno relatado numa frequência entre 1% e 9% das novilhas nascidas de fêmeas infectadas (BISHOP *et al.*, 1994). Essas novilhas apresentam-se sorologicamente negativas ou com títulos instáveis (NIELSEN; DUNCAN, 1990) e soroconvertem na metade da primeira prenhez. Nesse caso, a vacinação é ineficaz (BISHOP *et al.*, 1994). Não há comprovação desse fenômeno em búfalos.

Embora os mecanismos de transmissão da brucelose bovina e bubalina sejam basicamente os mesmos, algumas particularidades do comportamento dessa última espécie devem ser consideradas antes do estabelecimento de um programa de controle. A forma de criação bubalina é quase que exclusivamente extensiva, com a utilização de grandes áreas, proporcionando acesso contínuo a diversos tipos de ecossistemas. Além disso, são animais fortes e possuem hábitos migratórios e gregários. Movimentam-se principalmente à noite pelos pastos, rios e aguadas e, se desagregados ou à procura de alimento ou água, podem destruir cercas e entrar em contato com outros grupos de animais, aumentando a possibilidade de difusão da doença. O hábito de o búfalo banhar-se, visando a termorregulação corpórea, bem como o pastoreio em aguadas e açudes, tornam a espécie mais exposta a determinados microrganismos entre os quais as brucelas, pois nesses ambientes a sobrevivência da bactéria é ampliada (MARQUES; CARDOSO, 1997; WRAY, 1975).

A brucelose provoca grandes prejuízos econômicos para a bubalinocultura devido a problemas reprodutivos acarretados pela doença (TIMONEY *et al.*, 1988). MARQUES; CARDOSO (1997) referem que é a principal causa de abortamento em rebanhos bubalinos na Índia, na Itália e no Brasil. Algumas fêmeas que abortam permanecem estéreis devido às lesões crônicas no útero (GENTILE, 1957). DASET *et al.* (1990) relataram abortamento entre três meses e meio e quatro meses e meio de gestação, em 50% das búfalas estudadas. Além disso, seu principal produto com maior valor agregado, a mussarela frescal, deve provir de animais sãos. Portadores não identificados, além de servirem como fonte de infecção para o rebanho, podem eliminar a bactéria pelo leite. O leite, ingerido *in natura* ou sob a forma de derivados sem a prévia pasteurização, pode causar brucelose no homem (USDA, 2006). O

sistema de manejo extensivo, o insipiente programa de controle sanitário no Brasil, os grandes rebanhos, as condições ambientais das propriedades e a crença equivocada de que os búfalos são imunes a algumas doenças que acometem bovinos dificultam o controle da brucelose em bubalinos (GUARINO *et al.*, 2001). FOSGATE *et al.* (2002) sugerem a existência de características epidemiológicas distintas entre bovinos e bubalinos que ratificam a necessidade de novos estudos desse tema, pois a maioria dos trabalhos sobre a brucelose animal refere-se à espécie bovina.

A *B. abortus* foi isolada tanto do búfalo indiano (*Bubalus bubalis*) como do búfalo africano - *Syncerus caffer* (BISHOP *et al.*, 1994). Investigações sorológicas com o *S. caffer* na África detectaram mais de 30% de reatores, indicando que a espécie pode ser importante reservatório para bovinos quando ambos ocupam o mesmo ambiente (METCALF *et al.*, 1994). FOSGATE *et al.* (2002) relataram taxa de prevalência, nas ilhas de Trindade e Tobago, situadas no Caribe, entre 4% e 57%. No Brasil, MATHIAS *et al.* (1998) observaram 10,4% de animais reatores em 11 focos (68,8%) de 16 rebanhos estudados na região do Vale do Ribeira, SP, e de MOTTA *et al.* (2002), que encontraram 11% de reatores em oito rebanhos do Estado de Minas Gerais.

Basicamente, os programas de controle e erradicação da brucelose em bovinos e bubalinos apóiam-se em vacinação em massa de bezerras com a estirpe B19 ou RB51 e na certificação de rebanhos livres (OMS, 1986; SCHURIG *et al.*, 2002).

Até o momento, somente as vacinas vivas conferiram imunidade satisfatória contra a brucelose. A mais utilizada no mundo é a B19 (ADAMS, 1990). No Brasil, a vacinação com a B19 é obrigatória em fêmeas de bovídeos com três e oito meses de idade (BRASIL, 2006). Sendo estável, protege contra a infecção e o abortamento em cerca de 60 a 75%, de acordo com a prevalência da doença no rebanho. CORBEL (1997) constatou que a atenuação e baixa patogenicidade derivam de perda de 702 pares de base do gene eritrose-1-fosfato de-hidrogenase (Ery) durante a mutação espontânea ocorrida com a estirpe e, por isso, não há produção da enzima D-Ery, o que inibe a sua multiplicação, além de causar acúmulo do produto tóxico intermediário D-eritrose-1-fosfato. Assim, a B19 não se beneficia da degradação do eritritol, tendo, inclusive, seu crescimento inibido por ele (ADAMS, 1990). Seu inconveniente é a presença da CO, que induz anticorpos aglutinantes nos primeiros meses pós-vacinais, além de ser patogênica para bovídeos machos e outras espécies incluindo o homem.

A RB51 é outra vacina viva contra a brucelose, desenvolvida para bovinos. Trata-se de uma mutante rugosa, rinfampicina-resistente e com características semelhantes às da B19. Porém, devido à ausência da

CO, não induz a formação de anticorpos detectáveis pelos testes utilizados no sorodiagnóstico da *B. abortus* (SCHURIG *et al.*, 2002). Outro fator a ser considerado a seu favor é que a sua virulência é comprometida (SCHURIG, 1997), provavelmente também devido à ausência da CO (QUINN *et al.*, 1994). Este é um bom argumento para justificar a sua utilização em fêmeas adultas não reatoras visando o aumento da cobertura vacinal em situações de alto risco de infecção; ou em fêmeas desprovidas da proteção conferida pela B19 devido à idade avançada ou a falhas na vacinação (PAULIN, 2006a).

O SORODIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE EM BOVINOS E BUBALINOS

As operações de certificação de rebanhos livres apoiam-se no diagnóstico indireto. É estabelecida uma rotina de testes, a intervalos regulares, com sacrifício dos animais positivos até a obtenção de três ou mais testes negativos para todos os animais de reprodução. Como o diagnóstico positivo significa a remoção do animal da população, as características de sensibilidade e especificidade dos testes são muito importantes, pois resultados falso-positivos significam sacrificar animais sadios, e resultados falsos negativos significam deixar fontes de infecção em contato com animais sadios (PAULIN, 2006b).

O diagnóstico definitivo de qualquer doença é obtido por isolamento e identificação do agente (BRICKER, 2002). No entanto, os métodos diretos são inviáveis quando se trabalha com rebanhos. Assim, os programas de combate à brucelose baseiam-se no sorodiagnóstico, levando-se em conta a escolha dos testes a serem aplicados, as suas características intrínsecas, o custo, a praticidade de execução e a situação epidemiológica da doença na região (PAULIN, 2006a). Os testes oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) do Brasil são o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), o teste 2-mercaptoetanol (ME) e o teste de fixação do complemento - FC (BRASIL, 2006).

Os melhores testes para o sorodiagnóstico da brucelose baseiam-se na detecção do anticorpo IgG₁, o mais prevalente em animais naturalmente infectados. Os testes imunoenzimáticos (ELISA Indireto - ELISAI e ELISA Competitivo - ELISAC) e o FC são os que apresentam menor limiar de detecção para essa classe de anticorpo (WRIGHT; NIELSEN, 1990).

Há vários testes sorológicos aplicados ao soro diagnóstico da brucelose que utilizam antígeno acidificado tamponado, tais como o do antígeno brucélico ácido tamponado para prova rápida em placa (BPA) e o AAT. O mais difundido é o AAT. São

testes qualitativos, rápidos, baratos, de simples execução e possuem ótima sensibilidade e boa especificidade (KRUIZE, 1975). A OIE refere que o AAT é a melhor alternativa para o diagnóstico em massa (OIE, 2006). NICOLETTI (1969) demonstrou que o AAT detectou alta percentagem de animais positivos ao exame direto. HUNTER; ALLEN (1972) constataram que o AAT detectou o maior número de reatores positivos ao exame direto.

O SLT, executada em pH neutro, apresenta alta sensibilidade analítica para a detecção dos isotipos bovinos com uma exceção importante: o anticorpo IgG₁ (WRIGHT; NIELSEN, 1990). ALTON (1978) refere que o desempenho do SRP é semelhante ao do SLT.

OME inativa a atividade aglutinante do anticorpo IgM mediante processo químico, pois reduz as pontes dissulfídicas da sua estrutura pentamérica e a degrada em cinco subunidades não aglutinantes (TIMONEY *et al.*, 1988). O teste, eficiente para bovinos e bubalinos (SANDHU; JOSHI, 1993), detecta tanto anticorpos IgG₁ como IgG₂ (NIELSEN *et al.*, 1984). Além disso, o tratamento com o ME pode provocar aumento na sensibilidade, pela otimização da reatividade de IgG₁ (NIELSEN; DUNCAN, 1990; WRIGHT; NIELSEN, 1990). Assim, além do ME possuir boa especificidade (DAJER *et al.*, 1999; NIELSEN, 1995), também apresenta boa sensibilidade relativa (PAULIN *et al.*, 2002). NICOLETTI (1969) relatou concordância de 97% entre o ME e o FC. PAULIN *et al.* (2002) encontraram valores de Kappa de 91,9% e 88,5% entre o ME e o FC. Como desvantagens, pode-se citar o tempo para a realização do teste (48 horas), grande volume de reagentes e vidraria utilizados por amostra, bem como a manipulação de um reagente tóxico (NIELSEN, 2002).

O teste do ME deve ser executado junto com a SLT, pois não detectar IgM, não é um teste adequado para casos de infecções agudas, que podem apresentar resultado negativo para esta classe de imunoglobulinas que variam de 25 a 200 na SLT (BERCOVICH, 1998). O segundo motivo está ligado ao fenômeno prozona. NICOLETTI (1992) demonstrou a ocorrência de falsos negativos ao ME atribuída a esse fenômeno.

O teste do FC é o que apresenta melhor correlação com os isolamentos em animais natural ou experimentalmente infectados (NIELSEN, 1995), o que levou à sua adoção como *gold standard* para a avaliação de outros testes sorológicos, por isso o Código Zoossanitário Internacional a determinou como teste de referência para o comércio internacional de animais (OIE, 2006). Quando feita a quente é mais prática, há menos reações anticomplementares e menor reatividade de anticorpos da classe IgM, elevando a sua especificidade (CHAPPEL, 1989). Detecta precocemente anticorpos IgG₁ no soro (HILL, 1963) e revela casos crônicos, quando o anticorpo IgG₁ está em baixas concentrações e não pode ser detectado em

testes de aglutinação (KRUIZE, 1975). NIELSEN *et al.* (1995) citam que o anticorpo IgG₁ é o único detectado pelo FC em bovinos, o que eleva sua especificidade e geralmente não interfere no seu desempenho, pois o anticorpo IgG₁ predomina sobre a classe IgG₂ em animais infectados (WRIGHT; NIELSEN, 1990). ALTON (1978) refere que o FC é menos influenciado por anticorpos vacinais quando comparado a testes de aglutinação, sobretudo após o oitavo mês pós-vacinal. NICOLETTI (1985) detectou soros de bubalinos com atividade fixadora de complemento, porém sem atividade aglutinante.

As desvantagens do teste de FC aplicado ao sorodiagnóstico da brucelose animal são: o teste é trabalhoso, exige mão de obra especializada e controle rígido dos reagentes envolvidos. Além disso, em raras situações, a predominância do anticorpo IgG₂ pode impedir a ligação do anticorpo IgG₁ ao antígeno, ocasionando resultados falso-positivos. Não são claras as causas desse fato, mas sugere-se a idade avançada do animal, exposições repetidas ao agente, estresse e transferência ativa do anticorpo IgG₁ para o colostro no período periparto (BRANDON *et al.* 1971; CHAPPEL, 1989). BRANDON *et al.* (1971) e TIMONEY *et al.* (1988) afirmam que, embora o anticorpo IgG₂ não fixe complemento, reage com o antígeno, gerando uma leitura semelhante ao fenômeno de prozona, que resulta em reação falso-negativa. Nesses casos, outro teste de sensibilidade e especificidade relativas elevadas teria importante papel na análise final da amostra.

O teste imunoenzimático aplicado ao sorodiagnóstico da brucelose animal que tem apresentado melhor resultado é o ELISAC, pois apresenta elevadas sensibilidade (Sr) e especificidade relativas -Er (Quadro 1). Além disso, não apresenta o fenômeno de prozona como ocorre no teste do FC e o processo pode ser automatizado (NIELSEN *et al.*, 1995). As desvantagens são o investimento inicial e o tempo relativamente longo para a sua realização, caso o processo não esteja automatizado.

Recentemente, um novo teste tem sido desenvolvido para o sorodiagnóstico da brucelose em diversas espécies, o teste da polarização fluorescente - PF (NIELSEN *et al.*, 1996). Baseia-se nas diferenças rotacionais entre o antígeno solúvel (LPS) e o complexo antígeno-anticorpo (ag-ac). Quando o animal não possui anticorpos, o LPS gira sozinho e aleatoriamente a uma velocidade muito alta, que resulta em uma baixa despolarização de luz. Porém, se o animal possui anticorpos, formar-se-á o complexo ag-ac que é mais pesado e movimentar-se mais lentamente, fazendo com que despolarização da luz ocorra em uma velocidade maior. A diferença das velocidades das despolarizações é medida por um analisador de polarização de fluorescência (DAJER *et al.*, 1999; SAMARTINO *et al.*, 1999b). O PF possui as vantagens de

ser rápido (dois minutos), não requer etapas de lavagens para a remoção de reagentes e, como o equipamento possui características portáteis, pode ser executado num laboratório simples (NIELSEN *et al.*, 2001). O teste é relativamente barato, de fácil execução e está validado para o sorodiagnóstico da brucelose em bovinos, caprinos, suídeos e algumas espécies de animais silvestres (NIELSEN; GALL, 1998; NIELSEN *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2005). Requer menores volumes de soro que os testes convencionais e não é afetado pela hemólise (SAMARTINO *et al.*, 1999a). Além disso, acredita-se que seja capaz de distinguir animais vacinados dos não vacinados, embora não exista uma explicação razoável para esta característica (NIELSEN *et al.*, 1996; SAMARTINO *et al.*, 1998). Como desvantagem, pode-se citar o investimento inicial para a compra do equipamento.

NICOLETTI (1992) avaliou cinco testes sorológicos em soros de 64 fêmeas bubalinas submetidas à tentativa de isolamento de secreções mamárias (46 negativas e 18 positivas): o teste do cartão (TC - teste semelhante ao AAT), o Rivanol, o ELISAI, o FC e a SLT. A Sr do TC, do FC e do Rivanol foi de 100%. Porém, o autor relatou ocorrência de falso-positivos ao TC.

MATHIAS *et al.* (1998) examinaram 465 fêmeas de búfalos com histórico de vacinação desconhecido e compararam o desempenho do ELISAC frente à combinação do AAT e do FC. Os positivos para ambas as provas compuseram os *gold standards* positivos e da mesma forma foi composto o grupo de *gold standards* negativos. A Sr do ELISAC foi de 100% e o valor de Kappa foi de 0,97.

FOSGATE *et al.* (2002) compararam os parâmetros estimados entre os testes para bovinos e bubalinos em quatro rebanhos infectados por *B. abortus* e quatro rebanhos considerados livres de brucelose. Examinaram 391 soros de bovinos e 381 soros de bubalinos, divididos em subgrupos de vacinados e não vacinados. Os testes estudados foram a SRP, o TC, a BPA e a SLT, para os quais estimaram a Sr e a Er sem uso de *gold standard*, a partir de abordagem bayesiana, assumindo independência entre os testes. As Sr encontradas para bubalinos nos testes SRP, TC, BPA e SLT foram, respectivamente, 51,4%, 90,4%, 96,3%, e 75%. Para bovinos foram de 66,7%, 72,7%, 88,1%, e 80,2%. O BPA destacou-se como o melhor teste de triagem para búfalos.

MOLNÁR *et al.* (2002) examinaram 440 fêmeas bubalinas sem histórico de vacinação, com idade superior a três anos e provenientes de rebanhos livres e de rebanhos com prevalências variadas da infecção. Os testes empregados foram a SRP, o AAT, o ELISAI (com conjugado antibovino composto por anticorpo monoclonal) e dois diferentes ELISAC, um *kit* comercial (denominado ELISAC₂) e um desenvolvido pela FAO (denominado ELISAC₁). Os resultados do

ELISAC₁ foram tomados como *gold standard* para comparação com o resultados dos outros testes. As Sr do AAT, SRP, ELISAI e ELISAC₂ foram, respectivamente, de 93,0%, 79,3%, 98,6% e 97,1% e os Kappas encontrados foram, respectivamente, de 0,99, 0,54, 0,93 e 0,91.

Quadro 1 - Exemplos de sensibilidades e especificidades relativas, expressas em percentagem, dos testes empregados para o sorodiagnóstico da brucelose em bovídeos. São Paulo, 2007.

Teste	Sr	Er	Autor
AAT	99,6	83,1	(DAVIES, 1971)
	96,1	97,8	(SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999a)
	91,4	94,0	(MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*)
	84,3	81,4	(PAULIN <i>et al.</i> , 2005*)
TC	96,0	87,0	(CASAS-OLASCOAGA, 1976)
	88,1	98,1	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002)
	90,4	90,7	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*)
BPA	99,9	99,8	(SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999a)
	99,6	98,6	(VANZINI <i>et al.</i> , 1998)
	96,3	98,1	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*)
SLT	70,4	94,7	(NIELSEN; DUNCAN, 1990)
	70,4	94,7	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002)
	80,2	99,3	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*)
SRP	66,7	98,9	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002)
	51,4	99,3	(FOSGATE <i>et al.</i> , 2002*)
	79,3	86,3	(MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*)
	-	97,0	(NICOLETTI; MURASCHI, 1966)
ME	96,8	95,6	(PAULIN <i>et al.</i> , 2002)
	98,1	100,0	(PAULIN <i>et al.</i> , 2004)
	97,5	99,9	(NIELSEN, 1995)
	95,2	98,9	(UZAL <i>et al.</i> , 1995)
FC	93,3	95,5	(NIELSEN <i>et al.</i> , 1999)
	98,2	98,6	(SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999a)
	93,7	98,2	(PAULIN <i>et al.</i> , 2004)
ELISAI	96,2	99,7	(NIELSEN <i>et al.</i> , 2005)
	97,5	99,8	(SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999a)
	100,0	98,6	(MATHIAS <i>et al.</i> , 1998*)
ELISAC	100,0	99,3	(MOLNÁR <i>et al.</i> , 2002*)
	93,5	97,2	(NIELSEN <i>et al.</i> , 1999)
	98,1	99,6	(SAMARTINO <i>et al.</i> , 1999b)
	96,9	99,0	(DAJER <i>et al.</i> , 1999)
PF	92,0	98,4	(PAULIN <i>et al.</i> , 2005*)

Sr - sensibilidade relativa; Er - especificidade relativa; AAT - teste do antígeno acidificado tamponado; TC: teste do cartão ou "card Test"; BPA - antígeno brucélico ácido tamponado para prova rápida em placa; SLT - teste soroaglutinação lenta em tubos; SRP - teste soroaglutinação rápida em placa; ME - teste 2-mercaptoetanol; FC - teste fixação do complemento; ELISAI - teste imunoenzimático ELISA indireto; ELISAC - teste imunoenzimático ELISA competitivo; PF - teste de polarização fluorescente. *Teste aplicado em soro de bubalinos (*B. bubalus*).

PINTO *et al.* (2005) examinaram 90 fêmeas bubalinas não vacinadas de fazenda infectada por *B. abortus* e compararam os resultados do AAT, ME e FC entre si e do AAT frente à combinação do ME com o FC. A Sr do AAT foi de 93,0% quando comparado ao *gold standard* composto pela combinação do ME e FC. O valor de Kappa foi de 0,93.

PAULIN (2006) examinou 696 fêmeas bubalinas oriundas de propriedades que apresentavam histórico de falhas reprodutivas compatíveis com a brucelose e comparou os resultados do AAT, AAT europeu (AATE), BPA, SRP, SLT, ELISAI, ELISAC e PF frente à combinação do ME com o FC. Concluiu que: 1- os resultados dos exames com os testes ELISAC e PF em bovinos podem ser inferidos para bubalinos com razoável segurança; 2- devem ser estabelecidos pontos de corte específicos para búfalos para os testes da SLT, SRP e ELISAI; 3- as melhores combinações de Sr e Er foram alcançadas pelo ELISAC, a PF, a BPA e o AAT; 4- os melhores resultados de Kappa foram verificados para o ELISAC (0,93), seguidos da PF (0,84), da BPA (0,82) e do AAT (0,7); 5- a BPA e o AAT foram os melhores testes para triagem em bubalinos; 6- o ELISAC e o PF são os mais promissores testes confirmatórios nessa espécie, já que ganhos adicionais de especificidade podem ser alcançados pelo aumento do ponto de corte.

PAULIN (2006b) refere que a baixa Sr do ELISAI, aplicado ao sorodiagnóstico da brucelose em búfalos, pode ter sido resultado do conjugado utilizado no experimento, composto por anticorpos policlonais anti espécie bovina. Isotipos da molécula do anticorpo IgG₁ da espécie bovina apresentam pequenas variações em relação ao isotipo da molécula do anticorpo IgG₁ de bubalinos. O ideal seria produzir um conjugado específico para anticorpo monoclonal da classe IgG₁ anti espécie bubalina, visando melhorar a qualidade do ELISAI (PAULIN, 2006b). GUARINO *et al.* (2001) e MOLNÁR *et al.* (2002) utilizaram conjugados anti IgG₁ bubalino e encontraram valores muito bons de Sr e Er (100% e 98,6% relatados por GUARINO *et al.*, 2001, e 98,6% e 97,3% relatados por MOLNÁR *et al.*, 2002).

O Quadro 1 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade relativas de vários testes indiretos para o sorodiagnóstico da brucelose em bovídeos.

A brucelose, por ser zoonose e causar prejuízos à produção de carne e leite, tornou-se alvo de programas de controle e erradicação em vários países. Esses programas geralmente não fazem distinção entre as espécies bovina e bubalina, adotando estratégias comuns para ambas. Assim sendo, existe intensa atividade científica no sentido do aperfeiçoamento dos métodos de sorodiagnóstico da brucelose bovina. Como o interesse econômico pela espécie bubalina é mais restrito, naturalmente o número de estudos en-

volvendo búfalos é reduzido, havendo uma espécie de paradigma de que o que foi desenvolvido para bovinos também serve para bubalinos. Entretanto, na medida que a experiência bubalinos avança, esse paradigma perde o sentido e evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de estudos específicos para essa espécie, abandonando-se o hábito da transferência dos conhecimentos obtidos em bovinos. Desta forma, mais estudos devem ser realizados, visando o desenvolvimento de métodos específicos para o sorodiagnóstico da brucelose em bubalinos, de preferência com *gold standards* compostos a partir de métodos diretos.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumem I: bacteriosis y micosis*. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001, p.28-56. (Publicación Científica, 580).
- ADAMS, L.G. Development of live Brucella vaccines. In: ADAMS, L.G. (Ed.). *Advances in brucellosis research*. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p.251-276.
- ALTON, G.G.; MAW, J.; ROGERSON, B.A.; MCPHERSON, G.G. The serological diagnosis of bovine brucellosis: as evaluation of the complement fixation test, serum agglutination, and rose bengal tests. *Australian Veterinary Journal*, v.51, n.2, p.57-63, 1978.
- BARUSELLI, P.S. *Manejo reprodutivo de bubalinos*. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1993. 46p. (Manual Técnico).
- BATHKE, W. Brucellosis. In: BEER, J. (Ed.). *Doenças infecciosas em animais domésticos: doenças causadas por vírus, clamídias, rickettsiose, micoplasmose*. São Paulo: Roca, 1988. v.2, p.144-160.
- BEDFORD, C.A.; HARRISON, F.A.; HEAP, R.B. The metabolic clearance rate and production rate of progesterone and the conversion of progesterone to 20-hydroxypregn-4-en-3-one in the sheep. *The Journal of Endocrinology*, v.55, n.1, p.105-118, 1972.
- BERCOVICH, Z. Maintenance of *Brucella abortus* - free herds: a review with emphasis on the epidemiology and the problems in diagnosing brucellosis in areas of low prevalence. *Veterinary Quarterly*, v.20, n.3, p.81-88, 1998.
- BISHOP, G.C.; BOSMAN, P.P.; HERR, S. Bovine brucellosis. In: COETZER, J.A.N.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Ed.). *Infectious diseases of livestock*. Austin: Texas A&M University Press College Station, 1994. v.2, p.1053-1066.

- BRANDON, M.R.; WATSON, D.C.; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v.49, p.613-623, 1971.
- BRASIL. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. As doenças dos animais no Brasil: histórico das primeiras observações. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*. Brasília, 1988. 101p. Número especial.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina*. 9p. , Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>. Acesso em: 8 fev. 2006.
- BREW, S.D.; PERRETT, L.L.; STACK, J.A.; MACMILLAN, A.P.; STAUNTON, N.J. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record*, v.144, n.17, p.483, 1999.
- BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v.90, n.1/4, p.435-436, 2002.
- BUBBALIFE. *Búfalos*. Disponível em: <<http://www.bubbalife.com.br.html>>. Acesso em: 2 jan. 2006.
- CARMICHAEL, L.E. Abortion in 200 beagles (New reports). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.149, p.1126, 1966.
- CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, v.18 n.3/4, p.107-139, 1976.
- CHAPPEL, R.J. Diagnosis of bovine brucellosis: Principles, practice and problems. *Surveillance*, v.16, n.2, p.3-5, 1989.
- CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; PAQUET, J.Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; GODFROID, J. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infectology*, v.3 n.9, p.729-738, 2001.
- CORBEL, M. J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. *Veterinary Bulletin*, v.55, n.12, p.927-942, 1985.
- CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING ZOOSES, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 1., 1997, Jerusalem. *Proceedings*. Jerusalem: 1997, v.3, n.2, p.213-221.
- DAJER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; ZAPATA, D.; VILLEGAS, S.; GUTIERREZ, E.; PEÑA, G.; GURRIA, F.; NIELSEN, K.; GALL, D. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, n.3/4, p.67-73, 1999.
- DAS, L.V.M.; PARANJAPE, V.L.; CORBEL, M.J. Investigation of brucellosis-associated abortion in dairy buffaloes and cows in Bombay. *The Indian Journal of Animal Sciences*, v.60, n.10, p.1193-1194, 1990.
- DAVIES, G. The Rose Bengal test. *Veterinary Record*, v.88, p.447-449, 1971.
- EVANS, A.C. Comments on the early history of human brucellosis. In: LARSON, C.H., SOULE, M.H. (Ed.). *Brucellosis*. Baltimore: Waverly Press, 1950. p.1-8.
- EWALT, D.R.; PAYEUR, J.B.; MARTIN, B.M.; CUMMINS, D.R.; MILLER, W.G. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, n. 4, p.448-452, 1994.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Bovine brucellosis*. Health, diseases cards. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 mai. 2006.
- FOSGATE, G.T.; ADESIYUN, A.A.; HIRD, D.W.; JOHNSON, W.O.; HIETALA, S.K.; SCHURIG, G.G.; RYAN, J. Comparison of serologic tests for detection of *Brucella* infections in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*). *American Journal of Veterinary Research*, v.63, n.11, p.1473-1608, 2002.
- GARCIA-CARRILLO, C. *Animal and human brucellosis in the Americas*. Paris: Office Internationale Epizootique, 1990. 299p.
- GENTILE, A. Sulla brucellosi del bufali. *Veterinaria Italiana*, v.18, p.591-596, 1957.
- GUARINO, A.; FUSCO, G.; DI MATTEO, A.; URBANI, G.; CONDOLEO, R.; SERPE, L.; TITTARELLI, M.; DI VENTURA, M.; GALLO, P. Indirect ELISA for diagnosis of brucellosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Veterinary Record*, v.149, p.88-90, 2001.
- HILL, W.K. Standardization of the complement fixation test for brucellosis, *Bulletin Office Internationale Epizootique*, v.12, p.401, 1963.
- 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, Maastricht. *Proceedings*. Maastricht: 2000. p.204-210.
- HUNTER, D.; ALLEN, J. An evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. *Veterinary Record*, v.91, p.310-312, 1972.
- KEPPIE, J.; WILLIAMS, A.E.; WITT, K; SMITT, H. The role of erythritol in the tissue localization of the *brucellae*. *British Journal of Experimental Pathology*, v.46, p.104-108, 1965.

- 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 en el control de brucelosis bovina. II. Métodos serológicos. *Archives of Medicine Veterinary*, v.7, n.2, p.52-64, 1975.
- MANUAL MERCK, Capítulo 177. Seção 17, Infecções. Infecções bacilares. Brucelose. Disponível em: <http://www.manualmerck>. Acesso em: 12 dez. 2004.
- MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. *Anais. Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia*, 1997. p.10-221.
- MATHIAS, L.A.; GIRIO, R.J.S.; DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n.3/4, p.111-114, 1998.
- MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Veterinary Pathology*, v.26, p.513-515, 1989.
- MEGID, J.; ALBERT, D.; FAGLIARI, J.J.; PAES, A.C.; LISTONI, F.P.; PINTO, A.C.; RIBEIRO, M.G.; THIÉBAUD, M.; UENO, T.; GARIN-BASTIJI, B. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. *Veterinary Record*, v.156, n.5, p.147-148, 2005.
- METCALF, H.E.; LUCHSINGER, D.W.; RAY, W.C. Brucellosis. In: BERAN, G.W.; STEELE, J.H. (Ed.). *Handbook series in zoonosis. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.9-39.
- MEYER, M.E. Metabolic characterization of the genus *Brucella*. VI. Growth stimulation by erythritol compared with strain virulence for guinea pigs. *Journal of Bacteriology*, v.93, p.996-1000, 1967.
- MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; LIMA, E.S.C.; DIAS, H.L.T. Avaliação de seis testes sorológicos no diagnóstico da brucelose bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.2, p.41-44, 2002.
- MORENO, C.; ROJAS, N.; NIELSEN, K.; GALL, D. Comparison of different serological assays for the differential diagnosis of brucellosis. In: COLLING, A. (Ed.). *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Viena: International Atomic Energy Agency, 1998. p.153-161. (IAEA-TECDOC, 1055).
- MOTTA, P.M.C.; LEITE, R.C.; LOPES, L.B.; AMARAL, F.R.; PREGO, P.E.F.; LAGE, A.P. Brucelose e tuberculose em oito rebanhos de núcleo de bubalinos de Luz das Dores do Indaiá. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2002, Belo Horizonte. *Resumos*. Belo Horizonte, 2002. p.104.
- NICOLETTI, P.; MURASCHI, T.F. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problems cattle herds. *American Journal of Veterinary Research*, v.27, p.689-694, 1966.
- NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*, v.30, p.1811-1816, 1969.
- NICOLETTI, P. The serologic diagnosis of brucellosis in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1985, Cairo. *Proceedings*. Cairo, 1985. p.830-833.
- NICOLETTI, P. An evaluation of serological tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Tropical Animal Health and Production*, v.24, n.1, p.40-44, 1992.
- NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.27, p.9-17, 1995. n. Extraordinario. [Revisión Bibliográfica].
- NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.447-459, 2002.
- NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453p.
- NIELSEN, K.; GALL, D. Summary of field trials using the indirect and competitive enzyme immunoassays for detection of antibody to *Brucella abortus*. In: COLLING, A. (Ed.). *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Viena: International Atomic Energy Agency, 1998. p.107-111. (IAEA-TECDOC, 1055).
- NIELSEN, K.; HECH, F.; WAGNER, G.; STILLER, J.; ROSENBAUM, B.; PUGH, R.; FLORES, E. Comparative assessment of antibody isotopes to *Brucella abortus* by primary and secondary binding assays. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p.197-204, 1984.
- NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved CELISA for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.48, p.285-295, 1995.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; JOLLEY, M.; LEISHMAN, G.; BALSEVICIUS, S.; SMITH, P.; NICOLETTI, P.; THOMAS, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of Immunological Methods*. v.195, p.161-168, 1996.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; VIGLIOCCO, A.; PEREZ, B.; SAMARTINO, L. E.; NICOLETTI, P.; DAGER, A.; ELZER, P.; ENRIGHT, F. Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, n.68, p.245-253, 1999.

- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; KELLY, W.; YEO, J.; KENNY, K.; HENEGHAN, T.; MCNAMARA, S.; MAHER, P.; O'CONNOR, J.; WALSH, B.; CARROLL, J.; ROJAS, X.; ROJAS, F.; PEREZ, B.; WULFF, O.; BUFFONI, L.; SALUSTIO, E.; GREGORET, R.; SAMARTINO, L.E.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Veterinary Microbiology*, v.21, n.80, p.163-170, 2001.
- NIELSEN, K.; GALL, D.; SMITH, P.; BERMUDEZ, R.; MORENO, F.; RENTERIA, T.; RUIZ, A.; APARICIO, L.; VAZQUEZ, S.; DAGER, A.; LUNA-MARTINEZ, E.; SAMARTINO, L. E.; HALBERT, G. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Ruminant Research*, v.56, p.253-258, 2005.
- OGASSAWARA, S.; CURY, R.; D'APICE, V.B.; MENDES, M.F.M.; ROCHA, U.F. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.36, p.117-121, 1969.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. *Bovine brucellosis*. Article 2.3.1.1. Terrestrial Animal Health Code 2005, Part 2, Section 2.3, chapter 2.3.1. Disponível em: <<http://www.oie.int.htm>>. Acesso em: 23 agos. 2006.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis*. Genebra, 1986. 149p. (OMS-Série de informes técnicos, 740).
- PACHECO, G.; MELLO, M. T. *Brucelose*. Rio de Janeiro: Livraria Ateneu, 1956. 727p.
- PAULIN, L.M.S.; 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*, São Paulo, v.69, n.4, p.41-47, 2002.
- PAULIN, L.M.S.; FERREIRA NETO, J.S. *O combate à brucelose bovina. Situação atual*. Jaboticabal: Editora Funep, 2003. 154p.
- PAULIN, L. M. S.; CONDE, S. B.; FEDERSONI, I. S. P.; PACHECO, W. A.; SAMARTINO, L. E. Comparación de pruebas utilizadas en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina frente a la prueba de fijación de complemento. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 19., 2004, Buenos Aires. *Anais*. Buenos Aires, 2004. p.41-47, RES.491.
- PAULIN, L.M.S.; CONDE, S.B.; PACHECO, W.A.; FEDERSONI, I.S.P.; CAMPELO, A.C.; SAMARTINO, L.E. Estudio comparativo de la prueba de polarización fluorescente y la de fijación de complemento para el diagnóstico serológico de la brucelosis en búfalos (*Bubalus bubalis*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, 12., 2005, Montevideo. *Anais*. Montevideo: 2005. p.4, RES.258.
- PAULIN, L.M.S. Brucellosis en animales de América del Sur. Estrategias de control. In: CACCHIONE, R.A.; DURLACH, R.; LARGHI, O. P.; MARTINO, P. (Ed.). *Temas de zoonosis III*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis, 2006a. Cap. 13. p.130-140.
- 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, 2006b.
- PAYNE, J.M. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v.78, p.447-463, 1959.
- PINTO, M.R.A.; FAGLIARI, J.J.; MATHIAS, L.A.; MEGID, J.; SALGADO, V.R. Avaliação da prova do antígeno acidificado tamponado, em comparação com as provas de fixação do complemento e 2-mercaptoetanol, para o diagnóstico sorológico da brucelose em um rebanho bubalino (*Bubalus bubalis*) infectado por *Brucella abortus*. *Ars Veterinária*, v.21, p.147-154, 2005. Suplemento.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe Publishing, 1994. 648p.
- ROSS, H.M.; FOSTER, G.; REID, R.J.; JAHANS, K.L.; MACMILLAN, A.P. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Veterinary Record*, v.134, n.14, p.359, 1994.
- SAMARTINO, L.E.; ENRIGHT, F.; BAKER, R. Is the erythritol the causa of abortion by brucellosis? In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. *Anais*. Campo Grande, 1996. p.34, RES.491.
- SAMARTINO, L.E.; GREGORET, R.J.; SIGAL, E. Field trial of brucellosis competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). In: COLLING, A. (Ed.). *Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America*. Viena: International Atomic Energy Agency, 1998. p.163-167. (IAEA-TECDOC, 1055).
- SAMARTINO, L.E.; GALL, D.; GREGORET, R.J.; NIELSEN, K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine. *Veterinary Microbiology*, v.70, p.193-200, 1999a.
- SAMARTINO, L.E.; GREGORET, R.J.; GALL, D.; NIELSEN, K. Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *Journal of Immunoassay*, v.20, p.115-120, 1999b.
- SANDHU, K.S.; JOSHI, D.V. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic tests for brucellosis. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v.36, n.4, p.458-465, 1993.

- SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Títulos aglutinantes para "Brucella" em búfalos do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.28, p.35-39, 1969.
- SCHURIG, G.G. Vacinas contra brucelose: passado, presente e futuro. In: ANNIVERSARY OF BRUCellosIS RESEARCH CONFERENCE, 50. 1997, Chicago. *Annals*. Chicago, 1997. p.8-9.
- SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.479-496, 2002.
- SMITH, T. A characteristic localization of *Bacillus abortus* in the bovine fetal membranes. *Journal of Experimental Medicine*, v.29, p.451-455, 1919.
- SMITH, H.; KEPPIE, J.; PEARCE, .H.; FULLER, R.; WILLIAMS, A.E. The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. I. Isolation of *Br. abortus* from bovine foetal tissue. *British Journal of Experimental Pathology*, v.42, p.631-637, 1961.
- SPERRY, J.F.; ROBERTSON, D.C. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, v.121, p.619-630, 1975.
- TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. The genus *Brucella*. In: TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. (Ed.). *Hagan and bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*. London: Comstock Publishing Associates, 1988. p.135-152.
- TONHATI, H. O búfalo no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALININOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas. *Anais*. Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, 1997. p.210-221.
- 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. 2006.
- UZAL, F.A.; CARRASCO, E.A.; ECHAIDE, S.; NIELSEN, K.; ROBLES, C.A. Evaluation of an indirect ELISA for diagnosis of bovine brucellosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, n.4, p.473-475, 1995.
- VANZINI, V.R.; AGUIRRE, N.; LUGARESI, C.I.; DE ECHAIDE, S.T.; DE CANAVESIO, V.G.; GUGLIEMONE, A.A.; MARCHESINO, M.D.; NIELSEN, K. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, v.36, p.21-217, 1998.
- WRAY, C. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. *Veterinary Bulletin*, v.45, p.543-550, 1975.
- WRIGHT, P.; NIELSEN, K. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. (Ed.). *Advances in Brucellosis research*. Texas: A&M University Press, College Station, 1990. p.305-319.
- ZAKI, R. *Brucella* infection among ewes, camels and pigs in Egypt. *Journal of Comparative Pathology*, v.58, p.145-151, 1948.

Recebido em 11/9/06

Aceito em 31/3/08