

Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*)¹

Melina G.S. Sousa², Felipe M. Salvarani², Henrique A. Bomjardim², Antonio A. Fonseca Jr³,
Ingred S. Preis³, Marilene F. Brito⁴, Rômulo C. Leite² e José D. Barbosa^{2*}

ABSTRACT. - Sousa M.G.S, Salvarani F.M., Bomjardim H.A., Fonseca Jr A.A., Preis I.S., Brito M.F., Leite R.C. & Barbosa J.D. 2015. [**Placenta and intrauterine infection by *Brucella abortus* in buffaloes (*Bubalus bubalis*).**] Infecção transplacentária e intrauterina por *Brucella abortus* em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(11):882-888. Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará, Rodovia BR-316 Km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brazil. E-mail: diomedes@ufpa.br

The objective of this study was to detect *Brucella abortus* and injuries caused by the bacteria in fetal membranes and fetuses. Twenty buffaloes serologically positive for brucellosis were used and subjected to stamping for collection of material from the closed uterus of several months gestation. Fetal age was determined by ultrasound examination and the size of fetuses was measured at necropsy. The samples were subjected to histopathology and qPCR. From the second month of pregnancy on it was possible to detect the presence of *B. abortus* DNA in amniotic fluid, allantoic liquid and uterus, and from the fifth month on in placenta, heart, spleen, kidney, lung, intestine, liver and lymph nodes of the fetuses. The main pathological findings were fibrinous suppurative necrotic placentitis, and chronic endometritis.

INDEX TERMS: Brucellosis, buffaloes, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, transplacental infection.

RESUMO. - O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Brucella abortus* e as lesões causadas por esse agente nos anexos fetais e nos fetos de búfalos. Para isso, 20 búfalos em diversos meses de gestação, sorologicamente positivas para brucelose, foram submetidas ao abate sanitário. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos associados à mensuração dos fetos durante a necropsia. Do útero fechado desses animais foram coletadas amostras para histopatologia e qPCR. A partir do segundo mês de gestação foi possível detectar a presença de DNA de *B. abortus* em líquido amniótico, líquido alantoide e em útero e, a partir do quinto mês, na placenta, coração, baço, rim,

pulmão, intestino, fígado e linfonodos dos fetos. Os principais achados anatomopatológicos foram placentite fibrino-purulenta necrótica e endometrite supurativa crônica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Brucelose, búfalos, *Bubalus bubalis*, *Brucella abortus*, infecção transplacentária.

INTRODUÇÃO

A bubalinocultura tem importância no mundo inteiro, como fonte de proteína; é utilizada na tração, além de ser capaz de sobreviver em terras pobres e subsistir com baixa qualidade de forragens. No entanto, pesquisas específicas com bubalinos são limitadas, por não se tratar de um animal importante em muitos países que possuem os recursos necessários para realizar grandes projetos e assegurar a publicação dos resultados na literatura internacional (Fosgate et al. 2011).

O Brasil possui 1.277.199 bubalinos; a região Norte, com 820 mil animais, é a maior produtora do País, com destaque para o estado do Pará, que responde por 37,9% do rebanho nacional (IBGE 2011).

A brucelose, doença infecto-contagiosa de evolução geralmente crônica e de caráter granulomatoso, infecta as células do sistema mononuclear fagocitário. O principal agen-

¹ Recebido em 25 de maio de 2015.

Aceito para publicação em 18 de novembro de 2015.

² Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto de Medicina Veterinária, Campus de Castanhal, Universidade Federal do Pará (UFPA), Rodovia BR-316 km 61, Castanhal, PA 68741-740, Brasil. *Autor para correspondência: diomedes@ufpa.br

³ Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (Lanagro-MG), Av. Rômulo Joviano s/n, Fazenda Modelo, Pedro Leopoldo, MG 33600-000, Brasil.

⁴ Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

te para bubalinos, assim como para bovinos, é uma bactéria intracelular facultativa, a *Brucella abortus* biotipo 1 (Cheville et al. 1993, Fosgate et al. 2002, Megid et al. 2005, Xavier et al. 2009), que tem como principal fonte de contaminação a via digestiva (Payne 1959). A brucelose provoca grandes prejuízos econômicos devido a problemas reprodutivos (Corbel 1997) e é uma das zoonoses que também afeta o búfalo doméstico. Apesar de semelhanças com a brucelose bovina, as diferenças na epidemiologia da doença entre essas espécies são importantes no estabelecimento de medidas de controle (Fosgate et al. 2011).

No Brasil, o primeiro relato de brucelose em búfalos foi efetuado por Santa Rosa et al. (1969), que encontraram 40,9% (27/66) dos búfalos reativos ao teste de soroaglutinação rápida em placa. No entanto, o primeiro isolamento em búfalas adultas no Brasil foi estabelecido por Ogasawara et al. (1969) a partir do conteúdo de um hígroma articular, do qual isolou *B. abortus*. Posteriormente, outros trabalhos evidenciaram a presença de brucelose nessa espécie, por meio de testes sorológicos (Bastianetto et al. 2005). No estado do Pará, a prevalência encontrada foi de 3,67% (176/4796) bubalinos positivos ao teste 2-mercaptopetanol (2-ME) (Silva et al. 2014).

Esta enfermidade foi diagnosticada em ruminantes domésticos no Egito, onde se demonstrou a presença de estirpes de *B. suis* e *B. abortus*, identificadas por meio de PCR, em ruminantes domésticos incluindo-se os bubalinos (Menshaw et al. 2014), e em Trinidad e Tobago, por meio de testes sorológicos e bacteriológicos (Fosgate et al. 2002), bem como no Paquistão onde também foi identificada *B. abortus* em explorações pecuárias privadas (Nasir et al. 2004).

Além de provocar aborto a brucelose causa placentite necrosante fibrinosa (Payne 1959, Palmer et al. 1996, Pérez et al. 1998, Xavier et al. 2009), com produção de exsudato amarelo acastanhado e odor fétido, contendo fibrina, restos necróticos e infiltrados perivascularares no útero (Xavier et al. 2009).

O diagnóstico desta enfermidade em bubalinos vem sendo realizado da mesma forma que para os bovinos, através de diferentes testes sorológicos e do isolamento do agente. As provas sorológicas empregadas no diagnóstico são teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Fixação do Complemento (FC) e teste de Polarização Fluorescente (PF) (Nielsen 2001). Porém, podem ser empregados outros testes como o imunoenzimático competitivo (ELISA-C) (Paulin et al. 2012) e ensaio imunoenzimático com proteínas-G (ELISA-G) (Kumar & Chand 2011).

Um teste que vem se destacando no diagnóstico da brucelose é o teste de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) por apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade (Hinić et al. 2009, Caitano et al. 2014).

Não foram encontrados dados que demonstrassem a presença de *B. abortus* na espécie bubalina, assim como as lesões causadas por esse agente nos anexos fetais e no feto de bubalinos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *B. abortus* em búfalas sorologicamente positivas para brucelose, assim como caracterizar as lesões histológicas causadas por esse agente, nos anexos fetais e nos fetos de búfalas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram utilizadas 20 búfalas mestiças da raça Murah, primíparas, provenientes da Ilha de Marajó, estado do Pará, com 24 a 30 meses de idade, sorologicamente positivas para brucelose. As búfalas passaram por um período de adaptação de seis meses em uma propriedade no município de Castanhal, PA, e foram submetidas à inseminação artificial; nas que não emprelharam foram realizados repasse com o touro através de monta natural.

Coleta das amostras. Para confirmação da enfermidade foram coletadas amostras de sangue por venopunção da jugular, em tubos de 10mL à vácuo; o soro foi separado por meio de centrifugação a 3000rpm por cinco minutos e foram armazenados a -20°C até a realização do teste sorológico. Os soros foram analisados por meio do teste de triagem do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e os testes confirmatórios de Fixação do Complemento (FC) e Polarização Fluorescente (PF) conforme recomenda o Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (Brasil 2006). Todos os testes foram realizados no Instituto Biológico em São Paulo.

Os animais do presente estudo, sorologicamente positivos para brucelose, foram submetidos ao abate sanitário em matadouros frigoríficos localizados nos municípios de Castanhal e Belém, estado do Pará, sob inspeção estadual e federal, respectivamente, conforme a legislação vigente. Foi realizada a coleta do útero fechado das 20 búfalas. Nas gestações até o quarto mês foram coletados líquido alantoide, líquido amniótico e útero. Nas gestações a partir do quinto mês, foram colhidas amostras de líquido amniótico, líquido alantoide, cotilédone, placenta, e dos fetos, fragmentos de fígado, rim, baço, pulmão, coração, intestino, linfonodo pré-escapular e líquido abomasal. A idade fetal foi determinada através de exames ultrassonográficos, realizados mensalmente, associados à mensuração do feto durante a necropsia, conforme recomendado por Barr et al. (1990).

As amostras foram coletadas em duplicata, com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), tubos e frascos esterilizados para coleta individuais. Uma das amostras foi congelada e enviada ao Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LBM Lanagro/MG) para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A outra amostra foi fixada em formol a 10% e enviada ao Setor de Anatomia Patológica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As amostras foram submetidas ao processamento de rotina para histopatologia, cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina e eosina (HE).

Extração de DNA. Todas as amostras de tecidos foram homogeneizadas e submetidas à extração de DNA genômico com o kit comercial *QIAamp Cador Pathogen mini kit* (Qiagen®), utilizando-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador de peso molecular 1Kb, corado com *Blue green* (LGCbio), visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado para verificação de sua qualidade.

PCR em Tempo Real (qPCR). O ensaio foi realizado utilizando-se os oligonucleotídeos Bru.is711.128.F (TGGTGCTGTCA-ATGAGGAC), Bru.is711.128.F (GACCTTCGGCAAATGGACAG), Bru.is711.128.S (5'.FAM-CGGCGTATCAGCCAGGGCAT-IowaBlack.3') para amplificação da sequência de inserção 711 do gênero *Brucella*. Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 2,5µL de DNA genômico; 2,0µL de cada primer à 10µM; 4,4µL de Água Mili-Q ultrapura, 0,6µL de MgCl₂, 1,0µL de sonda e 12,5µL de Mix Quantitect (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo do fornecedor. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50°C

por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 15 minutos, seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata em termociclador *Lig-*thCycler**[®] 480 II (Roche), com Software Release 1.5.0 SP4.

RESULTADOS

No Quadro 1 mostram-se os anexos fetais (líquido amniótico, líquido alantoide e útero) dos quais foi detectada a presença de *Brucella abortus* do primeiro ao quarto mês de gestação. Verificou-se que a partir do segundo mês foi possível detectar DNA de *B. abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide e útero.

No Quadro 2 observa-se a detecção de DNA de *B. abortus* em búfalas a partir do quinto mês de gestação, nas quais verificou-se a presença da bactéria nos líquidos amniótico e alantoide, placenta e cotilédone. Portanto, *B. abortus* foi detectada em 60% (12/20) dos animais no líquido amniótico, 65% (13/20) no líquido alantoide, 66,66% (8/12) na placenta, 33,33% (4/12) nos cotilédones e 25% (2/8) no útero.

O Quadro 3 mostra os tecidos fetais nos quais foram detectados DNA de *B. abortus* através da qPCR e o período gestacional das búfalas em meses no qual foi realizada a coleta.

Verificou-se que no quinto mês de gestação foi possível detectar DNA de *B. abortus* nos tecidos fetais, sendo que os órgãos nos quais foram detectados com maior frequência foram coração 58,33% (7/12), baço 58,33% (7/12), rim

Quadro 1. Detecção de DNA de *Brucella abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide e útero de fêmeas bubalinas brucélicas do 1º ao 4º mês de gestação

Identificação	Período gestacional	Anexos fetais		
		Líquido amniótico	Líquido alantoide	Útero
Búfala 1	1 mês	-	-	-
Búfala 2	1 mês	-	-	-
Búfala 3	2 meses	+	-	-
Búfala 4	2 meses	+	+	+
Búfala 5	3 meses	-	+	-
Búfala 6	3 meses	+	+	-
Búfala 7	4 meses	+	+	+
Búfala 8	4 meses	+	+	-

+ Positivo, - negativo.

Quadro 3. Detecção de DNA de *Brucella abortus* através da qPCR nos tecidos fetais e período gestacional das búfalas em meses

Identificação	Período gestacional	Tecidos fetais						
		Coração	Baço	Rim	Pulmão	Intestino	Fígado	Líquido abomasal pré-escapular
Búfala 9	5 meses	+	+	-	-	-	-	-
Búfala 10	5 meses	+	-	+	+	+	-	-
Búfala 11	6 meses	+	+	+	+	+	+	-
Búfala 12	6 meses	+	-	-	+	-	-	+
Búfala 13	7 meses	-	-	-	-	-	-	-
Búfala 14	7 meses	-	+	-	-	-	+	-
Búfala 15	8 meses	-	-	+	-	+	-	+
Búfala 16	8 meses	+	+	+	+	+	+	+
Búfala 17	9 meses	-	+	+	-	-	+	-
Búfala 18	9 meses	+	+	+	+	+	+	+
Búfala 19	10 meses	-	-	-	-	-	-	-
Búfala 20	10 meses	+	+	+	+	+	-	-

+ Positivo, - negativo.

Quadro 2. Detecção de DNA de *Brucella abortus* no líquido amniótico, líquido alantoide, placenta e cotilédone de fêmeas bubalinas brucélicas do 5º ao 10º mês de gestação

Identificação	Período gestacional	Anexos fetais			
		Líquido amniótico	Líquido alantoide	Útero	Cotilédone
Búfala 9	5 meses	-	-	+	+
Búfala 10	5 meses	+	+	-	-
Búfala 11	6 meses	+	+	-	-
Búfala 12	6 meses	-	-	+	+
Búfala 13	7 meses	+	-	+	-
Búfala 14	7 meses	-	+	+	-
Búfala 15	8 meses	-	-	+	-
Búfala 16	8 meses	+	+	+	-
Búfala 17	9 meses	-	+	-	+
Búfala 18	9 meses	+	+	+	-
Búfala 19	10 meses	+	+	-	-
Búfala 20	10 meses	+	+	+	+

+ Positivo, - negativo.

58,33% (7/12), pulmão 50% (6/12), intestino 50% (6/12), fígado 41,66% (5/12) e linfonodo pré-escapular 33,33% (4/12).

Achados anatomopatológicos

As lesões macroscópicas observadas nos bubalinos foram placentite com exsudato de coloração acastanhada e odor fétido, com áreas de necrose e fibrina, além de congestão e hemorragias multifocais (Búfalas 18 e 20) (Fig.1), e exsudato purulento nos placentomas (Búfalas 18 e 20) (Fig.2-3), útero com focos de necrose nos placentomas, exsudato fibrinopurulento com odor fétido e restos placentários (Búfala 20) (Fig.4), edema e hemorragia do corioalantoide intercotiledonário (Búfala 20) (Fig.5), carúnculas com exsudato fibrinoso multifocal na superfície de corte e outras carúnculas com congestão e áreas hemorrágicas (Búfalas 18 e 20) (Fig.6). Não foram encontradas outras alterações macroscópicas.

Achados histopatológicos

Observou-se placentite caracterizada pela presença de focos de necrose e denso infiltrado inflamatório por células polimorfonucleares, congestão, hemorragia e áreas com exsudação por fibrina. Em outras áreas também foi

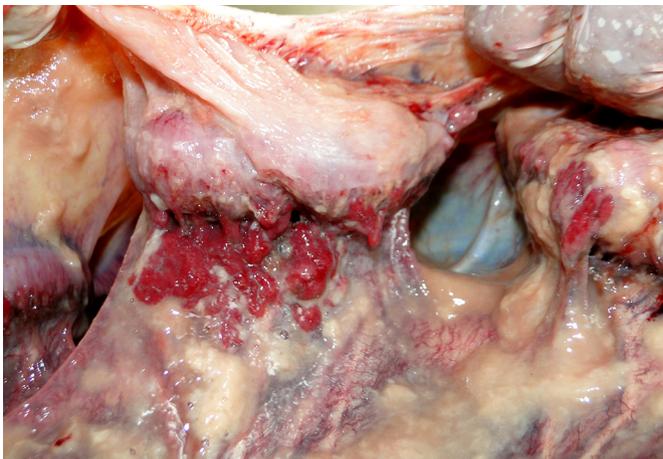
possível observar infiltrado inflamatório por linfócitos, plasmócitos e microgranulomas com alguns neutrófilos, e invasão e multiplicação de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas nas células trofoblásticas da placenta, muitas das quais necróticas (Búfala 20) (Fig.7-11), ou ainda endometrite supurativa crônica com áreas

de fibrose e presença de numerosas colônias bacterianas cocoides basofílicas na superfície endometrial ulcerada (Búfala 20).

Dentre os achados histopatológicos nos fetos bubalinos verificou-se fígado com infiltrados linfocitários em focos pequenos, distribuídos por todo parênquima, com lesão



1



2



3



4



5



6

Fig.1. Placentite com exsudato de coloração amarelo acastanhado com fibrina e áreas de necrose (Búfala 18).

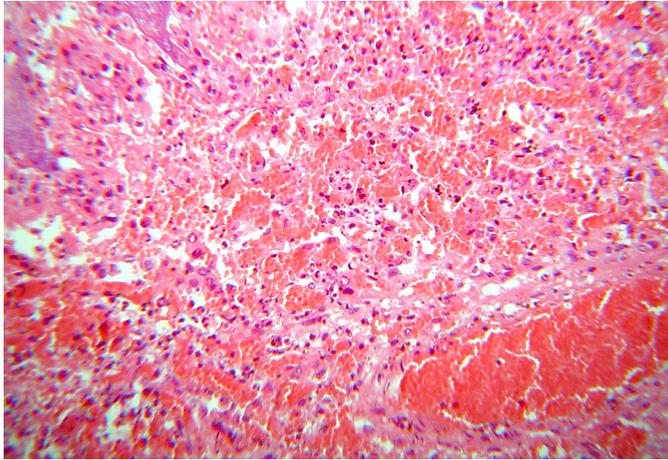
Fig.3. Congestão, hemorragia e exsudato purulento no placentoma (Búfala 18).

Fig.5. Edema e hemorragia do corioalantoide intercotiledonário (Búfala 20).

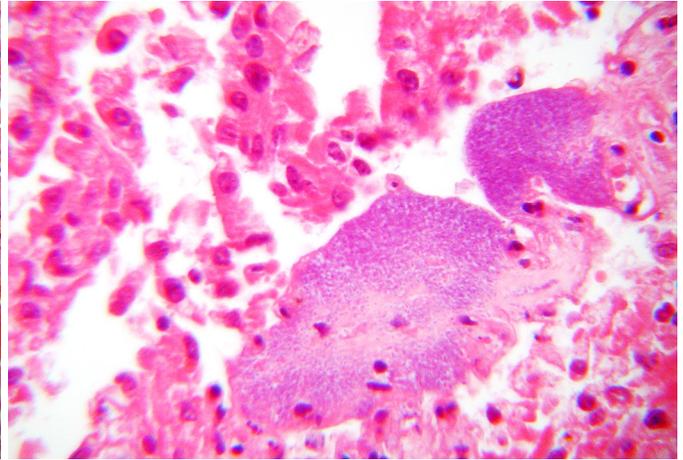
Fig.2. Congestão, hemorragia e exsudato purulento nos placentomas (Búfala 18).

Fig.4. Útero com necrose nos placentomas, exsudato fibrinopurulento e restos placentários (Búfala 20).

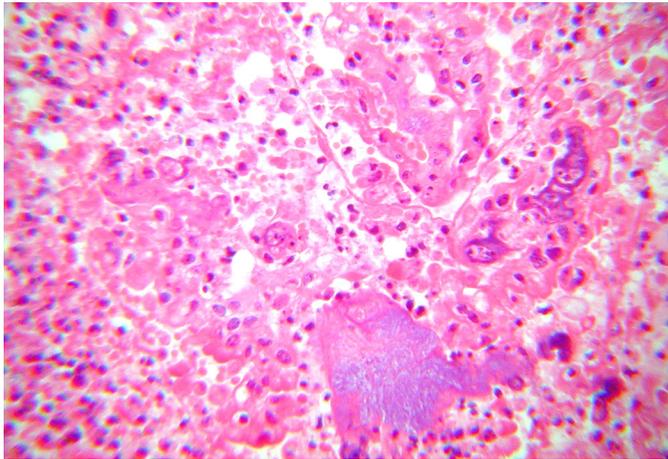
Fig.6. Exsudato fibrinoso multifocal na superfície de corte da carúncula, acima, e áreas de hemorragia na carúncula, abaixo (Búfala 18).



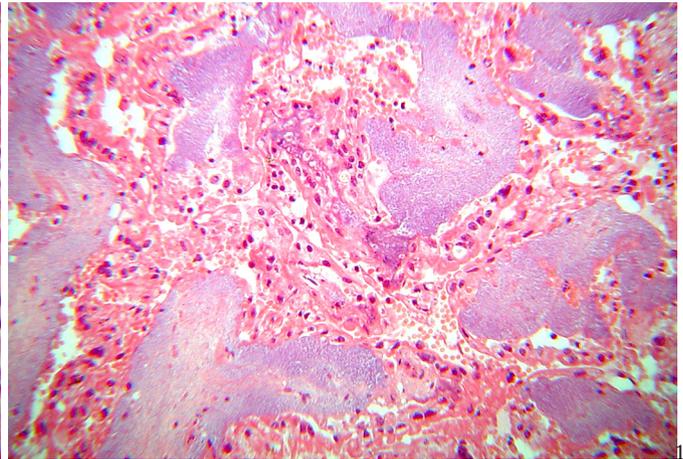
7



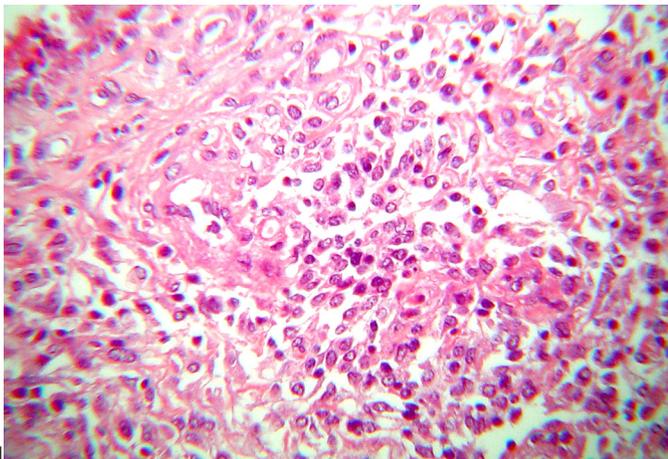
8



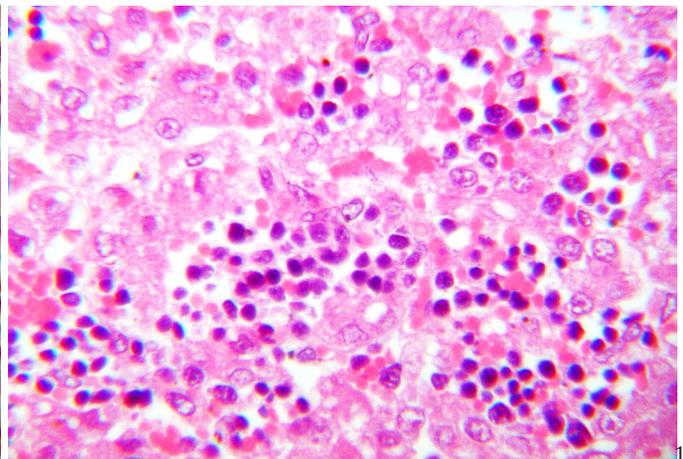
9



10



11



12

Fig.7. Colônias bacterianas basofílicas, congestão e hemorragia em placentoma (Búfala 20). HE, obj.16x.

Fig.9. Necrose e infiltrado inflamatório fibrinopurulento com colônias bacterianas basofílicas em placentoma (Búfala 20). HE, obj.25x.

Fig.11. Infiltrado inflamatório por linfócitos, plasmócitos, microgranuloma e alguns neutrófilos em placentoma (Búfala 20). HE, obj.25x.

Fig.8. Placenta com colônias bacterianas basofílicas nas células trofoblásticas, muitas das quais necróticas (Búfala 20). HE, obj.40x.

Fig.10. Placentoma com numerosas colônias bacterianas basofílicas (Búfala 20). HE, obj.16x.

Fig.12. Fígado com infiltrado linfoplasmocitário multifocal (Feto da Búfala 10). HE, obj.25x.

leve (Feto da Búfala 14) a moderada (Fetos das Búfalas 9, 10 e 12) (Fig.12), moderada vacuolização difusa dos hepatócitos (Feto da Búfala 14) e leve congestão no rim e baço (Feto da Búfala 16). Nos linfonodos foram observadas congestão, edema e fibrina moderados (Feto da Búfala 13).

DISCUSSÃO

Considerando-se que os bubalinos, diferentemente dos bovinos, apresentam um período médio de 10,5 meses de gestação (Cockrill 1967), as coletas foram feitas em dois animais em cada mês gestacional. Por meio da utilização da

técnica de PCR em tempo real, foi possível detectar a presença de DNA de *Brucella abortus* a partir do segundo mês de gestação nos líquidos amniótico, alantoide e no útero. Contudo, até o quarto mês de prenhez essa detecção foi feita somente nos líquidos fetais e no útero, pois somente a partir do quinto mês foram coletados tecidos fetais devido ao pequeno tamanho do feto; além disso, não foi possível observar placentomas ou qualquer tipo de conexão entre o endométrio e o córion em fetos bubalinos no terço inicial de gestação, à semelhança dos achados de Morini et al. (2008).

A partir do quinto mês de prenhez foi possível detectar a presença de *B. abortus* nos cotilédones e nos tecidos fetais, como coração, baço, pulmão, rim e fígado. Segundo Ko & Splitter (2003), após a bacteremia, as brucelas alojam-se em tecidos do sistema mononuclear fagocitário, depois invadem o lúmen uterino e as vilosidades coriônicas, pois há maior disponibilidade de elementos para sua multiplicação (produtos da degradação do eritritol, prostaglandina-F₂- α e o estradiol-17 β), para finalmente se disseminarem para as vísceras fetais por via hematogênica. Silva et al. (2009), em um estudo realizado em bovinos, utilizaram a PCR para detectar a presença de 12 diferentes agentes infecciosos associados a abortos em bovinos, o que resultou no diagnóstico etiológico em 19% dos casos, os quais avaliaram tecidos incluídos em parafina, e homogeneizados de vários tecidos fetais agrupados juntos e congelados. No estudo verificaram que *B. abortus* foi o agente etiológico detectado com maior frequência. Matrone et al. (2009), ao avaliarem a detecção de *B. abortus* por meio da PCR em amostras de órgãos homogeneizadas de fetos abortados e de bezerros nascidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa de *B. abortus* 2308, concluíram que o pulmão e o baço apresentaram maior probabilidade de sucesso na detecção da bactéria do que o fígado e linfonodo; no nosso estudo o coração, baço, rim, pulmão e intestino foram os órgãos que apresentaram uma maior detecção de *B. abortus*. Cortez et al. (2006) utilizaram macerados de pulmão e cérebro para detecção de DNA de *Brucella* spp. por meio da PCR de 114 fetos bovinos abortados e 10 bezerros com mortalidade perinatal dos quais 13% foram positivos. Nesse estudo de 12 pulmões analisados pela PCR em seis foram detectados DNA de *B. abortus*.

Das Búfalas 13 e 19 não foram detectados DNA de *B. abortus* nas vísceras fetais; a detecção foi feita somente nos líquidos amniótico, alantoide e placenta; provavelmente as concentrações de DNA genômico nas amostras estavam abaixo do limite de detecção.

As lesões macroscópicas observadas no presente estudo em búfalas foram placentite necrótica fibrinopurulenta; essas lesões também descritas por Payne (1959), Palmer et al. (1996), Pérez et al. (1998) e Xavier et al. (2009) em bovinos, além de hemorragias multifocais na placenta também descrita por Xavier et al. (2009) em bovinos. Os estudos na espécie bubalina em relação aos achados anatomopatológicos são escassos, contudo os achados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados em bovinos. Estudos realizados por Fosgate et al. (2002), Fosgate et al. (2003), Diptee et al. (2007), Adesiyun et al. (2010) em bubalinos,

com relação às respostas sorológicas a vacinas e infecções experimentais, têm demonstrado que os bubalinos são mais resistentes à infecção por *B. abortus* que os bovinos, e segundo Adesiyun et al. (2011) os búfalos tendem a ser infectados com estirpes de menor virulência. Isso provavelmente também influencia na capacidade de *B. abortus* causar lesões em bubalinos, como observadas nos animais do presente estudo, pois poucos animais apresentaram lesões macroscópicas significativas.

Os achados histopatológicos encontrados nos fetos bubalinos, tais como infiltrados linfoplasmocitários no fígado, com leve congestão em rins e baço, foram semelhantes aos descritos por Hong et al. (1991), em fetos bovinos, os quais descreveram lesões microscópicas que incluem processos inflamatórios vistos no fígado, baço e rim. A placentite fibrinossupurativa observada nos bubalinos do presente estudo caracterizada pela presença de necrose, congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório purulento com fibrina e numerosas colônias bacterianas cocoides, são semelhantes aos achados de Xavier et al. (2009), em bovinos infectados experimentalmente, que observaram placentite necrótica neutrofilica com infiltrado perivascular, associada com um grande número de *B. abortus* intracelularmente em macrófagos e trofoblastos e também extracelularmente em tecidos necróticos. De acordo com Anderson et al. (1986), os trofoblastos são as células alvo principal para a invasão e multiplicação de *B. abortus* na placenta. Samartino & Enright (1996) afirmam que o forte tropismo de *B. abortus* pelo útero se dá principalmente durante o último trimestre de gestação, devido às altas concentrações de eritritol e hormônios esteroides. Contudo, no presente trabalho foi possível verificar que no primeiro trimestre já existe a presença de *B. abortus* no útero dos bubalinos.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que é possível detectar DNA de *Brucella abortus* desde o segundo até o último mês de prenhez em bubalinos, tanto nos líquidos fetais quanto nos tecidos e mostra a transmissão intrauterina como rota de infecção na cadeia epidemiológica da brucelose em bubalinos.

Os achados anatomopatológicos significativos foram placentite fibrinopurulenta a necrótica e endometrite supurativa crônica.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de ajuda de custo referente ao processo 456376/2014-3.

REFERÊNCIAS

- Adesiyun A.A., Fosgate G.T., Persad A., Campbell M., Seebarsingh R. & Stewart-Johnson A. 2010. Comparative study on responses of cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) to experimental inoculation of *Brucella abortus* biovar 1 by the intraconjunctival route: a preliminary report. *Trop. Anim. Health Prod.* 42(8):1685-94.
- Adesiyun A.A., Fosgate G.T., Seebarsingh R., Brown G., Stoute S. & Stewart-Johnson A. 2011. Virulence of *Brucella abortus* isolated from cattle and water buffalo. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:13-16.
- Anderson T.D., Meador V.P. & Chevillat N.F. 1986. Pathogenesis of placenti-

- tis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Vet. Pathol.* 23:219-226.
- Barr B.C., Anderson M.L., Blanchard P.C., Daft B.M., Kinde H. & Conrad P.A. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27:354-361.
- Bastianetto E., Amaral F.R., Carvalho L.B., Oliveira D.A.A. & Leite R.C. 2005. Brucelose em rebanhos de búfalos criados na região do Alto São Francisco, Minas Gerais. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 29(1):55-56.
- Brasil 2006. Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT): legislação. Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, p.36-42.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54:1591-1597.
- Cockrill W.R. 1967. The Water Buffalo. *Scientific American* 217:118.
- Corbel M.J. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3:213-221.
- Cortez A., Castro A.M.G., Heinemann M.B., Soares R.M., Leite R.C., Scarcelli E., Genovez M.E., Alfieri A.A. & Richtzenhain. 2006. Detecção de ácidos nucléicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos bovinos abortados e em animais mortos no perinatal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6):1226-1228.
- Diptee M.D., Asgarali Z., Campbell M., Fosgate G. & Adesiyun A.A. 2007. Post-exposure serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) to *Brucella abortus* biovar 1 following vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 26(3):669-678.
- Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Johnson W.O., Hietala S.K., Schurig G.G., Ryan J. & Diptee M.D. 2003. Evaluation of brucellosis RB51 vaccine in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. *Prev. Vet. Med.* 58:211-215.
- Fosgate G.T., Adesiyun A.A., Hird D.W., Hietala S.K. & Ryan J. 2002. Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. *Vet. Rec.* 151:272-273.
- Fosgate G.T., Diptee M.D., Ramnanan A. & Adesiyun A.A. 2011. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:1479-1486.
- Hinić V., Brodard I., Thomann A., Holub M., Miserez R. & Abri C. 2009. IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Vet. Res.* 5:1-8.
- Hong C.B., Donahue J.M., Giles R.C.J.R., Poonacha K.B., Tuttle P.A. & Cheville N.F. 1991. *Brucella abortus*-associated meningitis in aborted bovine fetuses. *Vet. Pathol.* 28:492-496.
- IBGE 2011. Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 39. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm> Acesso em 29 out. 2015.
- Ko J. & Splitter G.A. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:65-78.
- Kumar M. & Chand P. 2011. Improvement in the diagnosis of *Brucella abortus* infections in naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) using an ELISA with a Protein-G-based indicator system. *Trop. Anim. Health Prod.* 43(8):1493-1499.
- Matrone M., Keid L.B., Rocha V.C.M., Vejarano M.P., Ikuta C.Y., Rodriguez C.A.R., Ferreira F., Dias R.A. & Ferreira Neto J.S. 2009. Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Braz. J. Microb.* 40:480-489.
- 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. 2005. Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. *Vet. Rec.* 156(5):147-148.
- Menshawy A.M.S., Perez-Sancho M., Garcia-Seco T., Hosein H.I., García N., Martínez I., Sayour A.E., Goyache J., Azzam R.A.A., Dominguez L. & Alvarez J. 2014. Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *BioMed. Res. Int.* 2014:1-7.
- Morini A.C., Barbosa P.L.G., Melnic R.V., Morini-Junior J.C., Francioli A.L.R., Martins D.S., Pereira F.T.V., Favaron P.O., Ambrósio C.E. & Miglino M.A. 2008. Caracterização das membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesq. Vet. Bras.* 28(9):437-445.
- Nasir A.A., Parveen Z., Shah M.A. & Rashid M. 2004. Seroprevalence of brucellosis in animals at government and private livestock farms in Punjab. *Pak. Vet. J.* 24(3):144-146.
- 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. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet. Microbiol.* 21(80):163-170.
- Ogassawara S., Cury R., D'apice V.B., Mendes M.F.M. & Rocha U.F. 1969. Higroma articular brucélico em búfalo, *Bubalus bubalis* (Linneu, 1758). *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 36:117-121.
- Palmer M.V., Cheville N.F. & Jensen A.E. 1996. Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings. *Vet. Pathol.* 33:682-691.
- Paulin L.M.S., Samartino L.E., Conde S.B., Federsoni I.S.P., Ferreira F., Amaku M. & Ferreira Neto J.S. 2012. Fluorescence polarization assay, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-C) and indirect ELISA for the diagnosis of brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Ciência Rural* 42(9):1621-1626.
- Payne J.M. 1959. The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow. *J. Pathol. Bacteriol.* 78:447-463.
- Pérez J., Quezada M., Lopez J., Casquet O., Sierra M.A. & Martín de las Mulas J. 1998. Immunohistochemical detection of *Brucella abortus* antigens in tissues from aborted bovine fetuses using a commercially available polyclonal antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:17-21.
- Ramnanan A., Diptee M., Asgarali Z., Campbell M. & Adesiyun A.A. 2012. Serological and bacteriological responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) vaccinated with two doses of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:1451-1458.
- Samartino L.E. & Enright F.M. 1996. *Brucella abortus* differs in the multiplication with in bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19:55-63.
- Santa Rosa C.A., Castro A.F.P. & Troise C. 1969. Títulos aglutinantes para "Brucella" em búfalos do Estado de São Paulo. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 28:35-39.
- Silva T.M.A., Oliveira R.G., Mol J.P.S., Xavier M.N., Paixão T.A., Cortez A., Heinemann M.B., Richtzenhain L.J., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Ciência Rural* 39(9):2563-2570.
- Silva J.B., Fonseca A.H. & Barbosa J.D. 2014. Serological survey of *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* and *Borrelia burgdorferi* in water buffaloes in the northern region of Brazil. *Revta Salud Anim.* 36(1):35-39.
- Xavier M.N., Paixão T.A., Poester F.P., Lage A.P. & Santos R.L. 2009. Pathology, immunohistochemistry and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Pathol.* 140(2/3):149-157.