

Diagnóstico de brucelose em rebanhos bovinos da região noroeste de Minas Gerais

Brucellosis Diagnosis in bovine herds in the northwest region of Minas Gerais

Mislene Lusía Rodrigues¹
Mariana Assunção Souza²

Resumo: Objetivou-se com este estudo avaliar a ocorrência de brucelose bovina em rebanhos leiteiros e os aspectos epidemiológicos presentes na região noroeste de Minas Gerais. Foram selecionados 30 rebanhos, sendo 5 de João Pinheiro, 4 de Presidente Olegário, 5 de São Gonçalo do Abaeté e 16 de Varjão de Minas. Foram coletadas 30 amostras de leite em tanques de expansão para detecção de anticorpos anti *Brucella abortus* (*B. abortus*), pelo teste do anel em leite (TAL). Dos rebanhos reagentes no TAL, foram selecionados três para avaliação no exame sorológico do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Para este teste foram coletadas amostras de sangue de 83 fêmeas, produtoras de leite, com idade acima de 24 meses. Foi aplicado um questionário epidemiológico aos produtores rurais das 30 fazendas selecionadas para o estudo. No exame do TAL, das 30 amostras analisadas, 4 foram reagentes. Das 83 amostras de soro sanguíneo testadas, apenas 1 (1,25%) animal foi reagente no AAT. No questionário epidemiológico, observou-se que 56% das fazendas tinham sistema de exploração misto, constituído de gado de leite e corte, 60% dos proprietários relataram a presença de animais silvestres, em 56,7% foi relatada a ocorrência de aborto nos últimos dois anos, 96,7% das propriedades não fazem nenhum tipo de manejo para descarte de restos placentários. Observou-se ainda que 100% dos proprietários relataram fazer a vacinação para brucelose nas fêmeas de 3 a 8 meses, com utilização da vacina B-19. O exame do TAL utilizado para vigilância epidemiológica realizado neste estudo demonstrou a possibilidade de resultados falsos-positivos, o que foi confirmado na avaliação sorológica de AAT. Apesar da baixa prevalência, a investigação da ocorrência de brucelose em bovinos deve ser constante, para que medidas de controle adequadas sejam tomadas.

Palavras-chave: *Brucella*. Teste Anel em Leite (TAL). Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).

Abstract: The objective of this study was to evaluate the occurrence of bovine brucellosis in dairy cattle herds and the epidemiological aspects present in the northwestern region of Minas Gerais. We selected 30 herds. Being 5 from João Pinheiro, 4 from Presidente Olegário, 5 from São Gonçalo do Abaeté and 16 from Varjão de Minas. Thirty samples of milk were collected in expansion tanks to detect antibodies to *Brucella abortus* (*B. abortus*), by the milk ring test (MRT). Of the reactive herds in MRT, three were selected for evaluation in the serological test of Acidified Buffered Antigen (ABA). For this test, blood samples were collected from 83 dairy-producing females older than 24 months. An epidemiological questionnaire was applied to the farmers of the 30 farms selected for the study. In the MRT examination, of the 30 analyzed samples 4 were reagent. Of the 83 blood serum samples, tested only 1 (1.25%) animal was ABA reagent. In the epidemiological questionnaire it was observed that 56% of the farms had a mixed farming system, consisting of cattle and dairy cattle, 60% of the owners reported the presence of wild animals, in 56.7% were reported the occurrence of abortion in the last two years, 96.7% of the properties does not make

¹ Graduanda do curso de Medicina Veterinária Minas (UNIPAM). E-mail: mislanelrodrigues@yahoo.com.br

² Docente do curso de Medicina Veterinária (UNIPAM). E-mail: marianaa@unipam.edu.br

any management for the disposal of placenta remains. It was also observed that 100% of the owners reported that they perform the vaccination for brucellosis in females from 3 to 8 months, using the B-19 vaccine. The MRT test used for epidemiological surveillance performed in this study showed the possibility of false-positive results, which was confirmed in the serological evaluation of ABA. Despite the low prevalence, the investigation of the occurrence of brucellosis in cattle must be constant, so that adequate control measures are taken.

Keywords: *Brucella*. Milk Ring Test (MRT). Buffered Acid Antigen (AAT) Test.

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira teve uma grande representação no mercado econômico brasileiro em 2016, em que o efetivo de bovinos atingiu a marca recorde de 218,23 milhões de cabeças, e apenas no 1º trimestre de 2017 foram abatidas 7,37 milhões de cabeças de bovinos sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária (IBGE, 2017).

Várias doenças podem interferir na sanidade desses animais. A brucelose é uma das doenças que pode acometer o rebanho bovino. É causada pela bactéria *Brucella abortus* (*B. abortus*), responsável por ocasionar aborto e esterilidade em bovinos. A infecção assume também importância na saúde pública, devido aos riscos que causa para os trabalhadores que compõem determinados grupos ocupacionais, como tratadores, veterinários, magarefes e laboratoristas (RAMOS *et al.*, 2008).

A eliminação do agente etiológico pode ser por diversas vias, como feto, membranas fetais e líquidos, descargas vaginais, leite, fezes e sêmen. Essa eliminação ocorre comumente após o parto ou aborto, sendo que os animais continuam eliminando a *Brucella* pelo leite e por descargas uterinas. As vacas em geral abortam no primeiro parto após a infecção, mas continuam eliminando o agente nos partos subsequentes de modo assintomático (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

A *B. abortus* sobrevive em alimentos como o leite e produtos lácteos cerca de 15 a 90 dias, dependendo da temperatura e do pH. A refrigeração inibe a multiplicação, porém a viabilidade é mantida mesmo em temperatura de congelamento. No entanto, a fervura do leite e os processos de pasteurização são eficazes na eliminação do microrganismo (PAULIN; FERREIRA NETO, 2003).

As perdas econômicas relacionadas à brucelose são desde abortos, baixos índices reprodutivos, aumento no intervalo entre partos, diminuição na produção de leite e morte de bezerros (UMEDA, 2014). Em 2001 foi criado o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Esse programa tem por objetivo reduzir a prevalência e a incidência dessas doenças em bovinos e bubalinos, visando à erradicação. O programa sugere um conjunto de medidas sanitárias compulsórias e voluntárias. As medidas compulsórias consistem na vacinação de bezerras entre os 3 e 8 meses de idade contra a brucelose e o controle do trânsito de animais, já as medidas voluntárias consistem na certificação de propriedades livres de brucelose ou de tuberculose (BRASIL, 2017).

Segundo Nicolletti (1980), grandes aglomerações de animais favorecem a difusão da *B. Abortus*, principalmente após episódios de abortamento, sendo assim a compra de animais representa fator de risco para introdução da brucelose em propriedades livres, sendo o risco variável de acordo com a fonte da compra desses novos animais (CRAWFORD; HUBER; ADAMS, 1990).

Objetivou-se com este estudo avaliar a ocorrência de brucelose em rebanhos bovinos leiteiros, e os aspectos epidemiológicos na região noroeste de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Patos de Minas, sob o protocolo n.156/17.

2.1 LOCAL

A pesquisa foi desenvolvida em parceria com um laticínio localizado na mesorregião Noroeste de Minas Gerais. Foram selecionadas 30 propriedades, sendo 5 no município de João Pinheiro, 4 em Presidente Olegário, 5 em São Gonçalo do Abaeté e 16 em Varjão de Minas.

2.2 ANIMAIS

Foram avaliadas vacas produtoras de leite com idade acima de 24 meses das raças mestiça e nelore.

2.3 AMOSTRAS

Foram coletadas 30 amostras de leite em tanques de expansão para detectar anticorpos anti *B. abortus*. Com auxílio de um coletor de aço inox, foram retirados do tanque de expansão 30 ml de leite e colocados em um frasco de plástico estéril. A amostra foi identificada usando um número para cada fazenda, a fim de identificar o rebanho avaliado. Em seguida, a amostra foi acondicionada em caixa isotérmica contendo gelo, mantendo a temperatura entre 2 a 8°C. Dessa forma, a amostra foi transportada até o laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), para a realização do teste do anel em leite (TAL).

Das fazendas identificadas como reagentes no teste (TAL), foram selecionadas 3 para coletas de amostras de sangue para a realização do teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). Foram coletadas amostras de sangue de 83 fêmeas. Os animais foram contidos em brete ou tronco de contenção da própria propriedade. Foram coletados 5 ml de sangue de cada animal, na veia coccígea, localizada no sulco central da parte ventral da cauda. As agulhas utilizadas foram de uso individual e descartáveis, as amostras foram acondicionadas em tubos a vácuo sem anticoagulante e identificados com o número do brinco de cada animal. Essas amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo, mantendo a temperatura entre 2 a 8°C e encaminhadas ao laboratório de Doenças Infecciosas do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

2.4 TESTE DO ANEL EM LEITE (TAL)

No laboratório, a amostra foi homogeneizada a fim de obter uma perfeita distribuição da gordura, foi pipetado 1 mL de leite e colocado em um tubo de ensaio de 13x100 mm. Em seguida foram adicionados 30 µL do antígeno (TECPAR), para o teste do anel em leite. Após a homogeneização, as amostras foram colocadas em banho maria a 37° C por uma hora.

Interpretação dos resultados:

- Anel de gordura azul e coluna branca ou azulada = reagente
- Anel de gordura branco e coluna de leite azul = não reagente

2.5 TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)

No laboratório, os tubos de sangue foram colocados na centrífuga por 10 minutos para a separação do soro sanguíneo.

A temperatura do laboratório foi ajustada a 22°C, as amostras de soro e o antígeno foram retiradas da geladeira pelo menos 30 minutos antes da realização do teste para que fosse equilibrada sua temperatura com a do ambiente. Os soros foram homogeneizados para iniciar o teste. Com o auxílio de uma pipeta, foram colocados 30 µL de soro por área da placa; essa quantidade foi depositada sobre a placa de vidro, encostando nela a ponta da pipeta em ângulo de 45°, agitou-se suavemente o antígeno e colocaram-se 30 µL ao lado do soro. Por meio de misturador simples (bastão de vidro) e com movimentos circulares, o soro e o antígeno foram misturados de modo a obter um círculo de aproximadamente 2 cm. Em seguida, a placa foi agitada com movimentos oscilatórios, numa frequência de aproximadamente 30 movimentos, 10 por minuto, de modo a permitir que a mistura soroantígeno fluísse lentamente dentro de cada círculo. Essa movimentação continuou durante 4 minutos. Em seguida, a placa foi colocada na caixa com luz indireta e procedeu-se à leitura. Os resultados foram anotados, desconsiderando as reações de aglutinação que vieram a ocorrer após os 4 minutos.

A interpretação dos resultados foi da seguinte forma:

- presença de grumos - reagente;
- ausência de grumos – não reagente.

2.6 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Foi elaborado um questionário para coletar informações dos aspectos epidemiológicos das propriedades investigadas.

As variáveis analisadas foram: quantidade de leite produzida, tipo ou sistema de exploração (leite e misto), tipo de criação (semi confinamento, extensivo), raças predominantes, número de bovinos na propriedade, presença de animais silvestres, destino da placenta e dos fetos abortados, compra e venda de animais, vacinação contra brucelose, abate de animais na propriedade, aluguel de pastos e a existência de piquete maternidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 propriedades avaliadas no TAL, foram detectados anticorpos anti *B. abortus* em 4 (13,3%) amostras de leite em tanques de expansão.

Em estudo realizado por Silva Júnior, Megid e Nozakil (2007), utilizou-se o TAL na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos que forneciam leite para um laticínio. Avaliaram-se 13 propriedades do interior de São Paulo, sendo coletadas 464 amostras de leite individual, obtendo 123 resultados reagentes no TAL. Destes apenas 30 amostras foram reagentes no AAT, sendo visto elevado percentual de resultados falso-positivos no TAL realizado individualmente, enquanto que o exame aplicado em amostras de leite obtidas em latões detectou 84,2% de latões contaminados no TAL e 75% de rebanhos infectados confirmados no AAT.

Mosquera *et al.* (2008) ressaltam que a positividade no TAL pode ser decorrente de reações cruzadas com outras bactérias, devido aos antígenos serem compostos por estruturas presentes na parede celular das brucellas semelhantes às de outras bactérias gram-negativas, como *Yersinia spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* Das 30 propriedades analisadas, 4 rebanhos foram positivos no TAL. Dos rebanhos positivos, foi coletado sangue

de animais provenientes de 3 propriedades para o teste sorológico de AAT, em que 1,2 % das amostras apresentaram anticorpos anti *B. abortus*, fato este que deve ser avaliado mais profundamente, pois em 100% das fazendas foi realizada a vacinação das fêmeas em idade de 3 a 8 meses, com utilização da vacina B19.

Nicolletti (2004) ressaltou que a vacina B 19 produz uma proteção de cerca de 70%, mas a sua eficácia varia dependendo de algumas variáveis, incluindo a idade. A presença de lipopolissacarídeos, com uma cadeia-O na cepa 19, explica a presença e persistência de anticorpos no soro após a administração da vacina. Esses anticorpos são detectados nos testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de brucelose e são o principal problema associado com a vacinação da cepa 19, porque impedem a diferenciação de bovinos vacinados com infectados.

Segundo Fernandes (2012), a vacinação diminui a incidência da doença clínica e a redução do número de organismos excretados por animais infectados. Observou-se neste estudo que os produtores aderem mais facilmente à vacinação como método de controle do que à prática de medidas de higiene e à remoção e abate dos animais soropositivos.

Na avaliação realizada pelo questionário epidemiológico, observou-se que 70% das propriedades produzem menos de 500 litros de leite dia, 56% das propriedades têm sistema de exploração misto, com gado de leite e corte e as raças de bovinos predominantes são animais mestiços, com 93,3 % ,e 6,7 % de animais nelores.

Gonçalves *et al.* (2009) realizaram um estudo para caracterizar a situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais e relatam que a prevalência de brucelose não se mostrou associada a características produtivas do rebanho, como, por exemplo, aptidão para leite ou para corte, criação intensiva ou extensiva, predominância de bovinos europeus ou de mestiços e nem mesmo tamanho do rebanho. Isso significa que as autoridades sanitárias terão dificuldade em estabelecer medidas sanitárias muito seletivas, dirigidas a determinado tipo de exploração do rebanho ou a um sistema de produção.

Nota-se que 80% das propriedades deste estudo são compostas por rebanhos pequenos, constituídos por menos de 500 animais. Esse fato é relevante, pois, segundo Nicoletti (1980), altas densidades de animais favorecem a difusão da infecção.

Os rebanhos avaliados foram representados por vacas leiteiras com idade acima de 24 meses. Radostits *et al.* (2002) ressaltam que a enfermidade atinge bovinos em todas as idades, porém é mais frequente em animais sexualmente maduros e em bovinos leiteiros. Identificou-se que 86,6% dos produtores rurais criam seus animais em sistema de semi confinamento, sendo apenas 13,4% dos animais criados totalmente a pasto. A transmissão do agente etiológico ocorre com mais intensidade por contato indireto com o agente, por ingestão de água, forragem, concentrado e qualquer outro alimento contaminado (BEZERRA, 2011).

Observou-se que em 60% das propriedades havia a presença de animais silvestres. Nava (2008) fez um levantamento dos patógenos causadores das principais doenças infecciosas, colhendo amostras de sangue tanto dos animais domésticos quanto de catetos, queixadas, marsupiais e onças, no Parque Estadual Morro do Diabo e em seu entorno, no Pontal do Paranapanema (SP). Apesar da crença popular que atribui aos animais silvestres a disseminação de doenças, o estudo demonstrou que muitos patógenos são diferentes nas populações silvestres e domésticas. No caso da brucelose, embora sejam doenças encontradas tanto no gado bovino quanto em catetos e queixadas, os patógenos são geneticamente diferentes, demonstrando que não houve transmissão entre silvestres e domésticos.

Em 56,7% das propriedades verificou-se a ocorrência de aborto nos últimos dois anos. Sabe-se que a brucelose é uma doença que causa aborto no último terço de gestação. Com o aborto, uma grande quantidade de bactérias é excretada com as secreções uterinas e o leite,

podendo infectar outros animais, já que esses microrganismos sobrevivem no ambiente por longos períodos (ANDREWS; BLOWEY; BOYD, 2008).

Em 86,7% das propriedades foi relatada a comercialização de animais com controle de GTA. (Guia de Trânsito Animal). Campanã, Gotardo e Ishizuca (2003) ressaltam que o controle de trânsito dos animais é um fator de grande importância para o controle da brucelose, pois fica condicionado à comprovação da vacinação contra brucelose no estabelecimento de origem dos animais.

Apesar de 96,7% das propriedades deste estudo não fazerem nenhum tipo de manejo para descartar restos placentários, deve-se reforçar a importância do manejo correto para descarte, visto que a principal forma de infecção da brucelose é por meio do contato direto com o produto de aborto, lambertura de membranas fetais, fetos abortados e bezerros recém-nascidos, além do hábito dos bovinos de cheirar ou lambem os genitais de outros bovinos. (DIVERS; PEEK, 2008).

Foi relatada por 50% dos proprietários a realização de abate de bovinos dentro de suas propriedades para o consumo próprio. Essa prática é um risco de infecção para pessoas que realizam o abate desses animais que podem estar infectados. Bevilacqua (2008) resalta que sorologias realizadas em funcionários de matadouros indicaram a prevalência de brucelose humana neste setor: Na Bahia, em 1972, 10,58 % de reagentes; Belo Horizonte, em 1984, 2,1 %, e Maranhão, em 1995, 2,17%.

Observou-se que 46,6% dos proprietários fazem aluguel de pastos de outras fazendas. A prática de alugar pastos como fator de risco indica contato indireto entre rebanhos, aumentando a possibilidade de contaminação de pastagens e de água por animais de outras propriedades. O agente, uma vez presente no ambiente, pode permanecer viável por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, aumentando de forma significativa a chance de contato e infecção de um novo indivíduo susceptível (NICOLETTI, 1980). A *Brucella* sp. é eliminada em fluidos e anexos fetais durante o parto ou abortamento e também por leite e sêmen (BRASIL, 2006).

Em 63,3 % das propriedades avaliadas há pastos maternidade. Esse fato é muito importante, pois diminui a exposição do rebanho ao agente presente em restos placentários. (FERNANDES, 2012).

Campanã, Gotardo e Ishizuca (2003) destacam o caráter intracelular da bactéria *B. abortus*, que dificulta no tratamento dos animais infectados, sendo de grande importância as medidas preventivas de vacinação e controle de trânsito dos animais, que têm importância fundamental no combate à doença.

4 CONCLUSÃO

O exame do TAL utilizado para vigilância epidemiológica realizado neste estudo demonstrou a possibilidade de resultados falso-positivos, o que foi confirmado na avaliação sorológica de AAT. Apesar da baixa prevalência, a investigação da ocorrência de brucelose em bovinos deve ser constante, para que medidas de controle adequadas sejam tomadas.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, A. H; BLOWEY, R.E; BOYD, R.G. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

BEVILACQUA, M. R. Brucelose em Bovinos. (Monografia). Especialização em Defesa e Vigilância Sanitária. Campo Grande-MS: Universidade Castelo Branco. 2008. 28p.

- BEZERRA, D.F.M. **Situação epidemiológica de brucelose bovina no estado de Roraima.** Monografia de Conclusão de Curso de Bacharelado em Zootecnia, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista. 2011. 61p.
- BRASIL. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e erradicação da Brucelose e Tuberculose PNCEBT.** Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, Brasília. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT).** Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2017.
- CAMPANÃ, R.N.; GOTARDO, D.J.; ISHIZUCA, M.M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina.** Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, 2003.
- CRAWFORD, R.P.; HUBER, J.D.; ADAMS, B.S. Epidemiology and surveillance. *In:* NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R (Ed.) **Animal brucellosis.** Boca Raton: CRC Press. 1990.
- DIVERS, T.J; PEEK, S.F. **Ribhuns's: Diseases of Dairy Cattle.** 2. ed. Missouri: Sauders Elsevier, 2008.
- FERNANDES, M. O. L. **Brucelose dos pequenos ruminantes:** estudo de focos na área administrativa da divisão de intervenção veterinária de Vila Real. Mestrado (Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2012.
- GONÇALVES, V.S.P et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, supl. 1, p.35-45, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- foi lido no IBGE Disponível em: https://www.ibge.gov.br//Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_2017_01caderno.pdf
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- MOSQUERA, C. X. et al. Detección de Brucella abortus por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos. **Rev. MVZ,** Córdoba, v.13, n.3, p. 1504-1513, 2008.
- NAVA, A. F. D. **Espécies sentinelas para a Mata Atlântica:** as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.
- NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to Brucella abortus, Yersinia enterocolitica O:9 and Escherichia coli O157:H7. **Veterinary Microbiology,** Amsterdam, [online], v. 100, n. 1-2, p. 25-30, mai. 2004.
- NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine,** v.24, p.69-98, 1980.
- PAULIN, L. M.; FERREIRA NETO, J. S. **O Combate à Brucelose Bovina:** situação brasileira. Jaboticabal: Funep, 154p. 2003.

RADOSTITS, O. M et al. **Clínica Veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara, 2002.

RAMOS, T.R.R. et al. Epidemiological aspects of on infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the Microrregion of Araguaina, Tocantins. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, v.12, n. 2, p.133-138, abr.2008.

SILVA JÚNIOR, F.F., MEGID, J.; NOZAKIL, C.M; PINTO, J.P.A.N. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.59, n.2, p.295-300, abr. 2007.

UMEDA, L.M.L. **Avaliação da persistência da vacina B19 pelo Teste do Antígeno Acidificado Tamponado e PCR em bezerras vacinadas**. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2014.