

EFEITO DA VACINA CONTRA BRUCELOSE BOVINA SOBRE A CAPACIDADE NEUTROFÍLICA DE REDUÇÃO DO NBT.

(EFFECT OF BRUCELLOSIS VACCINE ON NBT NEUTROPHILIC REDUCTION CAPACITY)

(EFECTO DE LA VACUNA CONTRA BRUCELOSIS BOVINA SOBRE LA CAPACIDADE NEUTROFÍLICA DE REDUCCIÓN DEL NBT)

**P. C. CIARLINI¹; D. B. A. ANTONIO²; F. BARBIERE³;
F. L. BONELLO⁴; F. L. F. FEITOSA⁵**

RESUMO

A fim de se avaliar o efeito da vacina contra brucelose sobre o teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), uma única dose da vacina contra brucelose bovina (Brucel-Vet, Biovet) foi aplicada em 13 bezerras. As amostras a serem processadas e avaliadas para os testes NBT estimulado (E) e NBT não estimulado (NE) foram colhidas antes da aplicação da vacina, bem como no 1º, 15º e 30º dias após a vacinação. Não foi verificada interferência da vacinação sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos para a prova NBT NE ($p > 0,05$). Um dia após a vacinação, associado a uma leucocitose por neutrofilia, ocorreu um aumento significativo ($p = 0,02$) dos valores da prova estimulada (NBT E). Não foi observada correlação significativa entre o teste de redução do NBT e as variáveis taxa plasmática de fibrinogênio e título de anticorpos para brucelose. Os resultados permitem concluir que a vacinação contra brucelose em novilhas causa uma interferência transitória (24 horas após) sobre o teste estimulado de redução do NBT, porém não sobre a capacidade espontânea do neutrófilo reduzir o NBT.

PALAVRAS-CHAVE: Metabolismo oxidativo. Fibrinogênio. Leucograma. Vacinas. Bovinos.

SUMMARY

Aiming at evaluating the effect of brucellosis vaccine on the nitroblue tetrazolium reduction test (NBT), one dose of brucellosis vaccine (Brucel-Vet, Biovet) was given to 13 female calves. The samples to be processed and evaluated for stimulated (S) NBT and non-stimulated (NS) NBT tests were drawn before vaccine application, as well as on the 1st, 15th, and 30th days after vaccination. Interference of the vaccination on the oxidative metabolism of the neutrophils was not verified for NS NBT test ($p > 0.05$). On the next day after vaccination, there was a significant increase ($p = 0.02$) of the stimulated proof values (S NBT) associated with a leukocytosis by neutrophilia. No meaningful co-relation between the NBT reduction test and the variable plasmatic rate of fibrinogen and antibody titer for brucellosis was noticed. The results allowed concluding that the vaccination of calves against brucellosis causes a transitory interference (24 hours later) on the stimulated NBT reduction test, but not on the spontaneous capacity of the neutrophils to reduce the NBT.

KEY-WORDS: Oxidative metabolism. Fibrinogen. Leukogram. Vaccine. Bovine.

¹ Médico Veterinário, Prof. Ass. Dr. Curso de Medicina Veterinária. Depto. de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Unesp - Araçatuba - SP. Rua Clóvis Pestana, 793 Jd. D. Amélia CEP 16050-680 - Araçatuba - SP - Brasil. E-mail: ciarlini@fmva.unesp.br

² Bolsista Fapesp, processo 02/02905-6 - Unesp/Araçatuba - SP

³ Acadêmico em Medicina Veterinária - Unesp/Araçatuba - SP

⁴ Médico Veterinário, Residente Curso de Medicina Veterinária - Unesp/Araçatuba - SP

⁵ Médico Veterinário, Prof. Ass. Dr. Curso de Medicina Veterinária - Unesp/Araçatuba - SP

Apoio Financeiro: FAPESP

RESUMEN

Con el fin de evaluar el efecto de la vacuna contra brucelosis sobre el teste de reducción del azul de nitro-tetrazolio (NBT), una única dosis de la vacuna contra brucelosis bovina (Brucel-Vet, Biovet) fue aplicada en 13 becerras. Las muestras, procesadas y evaluadas para los testes NBT estimulado (E) y NBT no estimulado (NE), fueron colectadas antes de la aplicación de la vacuna y 1, 15 y 30 días después de la vacunación. No fue verificada la interferencia de la vacunación en el metabolismo oxidativo de los neutrófilos en la prueba NBT NE ($p > 0,05$). Un día después de la vacunación ocurrió aumento significativo ($p = 0,02$) de los valores de la prueba estimulada (NBT E), en asociación a leucocitosis por neutrofilia. No se observó correlación significativa entre el teste de reducción del NBT y las variables tasa plasmática de fibrinógeno y título de anticuerpos para brucelosis. Los resultados permiten concluir que la vacunación contra brucelosis en novillas causa interferencia transitoria (24 horas después) sobre el teste estimulado de reducción del NBT, sin embargo no interfiere en la capacidad espontánea del neutrófilo de reducir el NBT.

PALABRAS-CLAVE: Metabolismo oxidativo. Fibrinógeno. Leucograma. Vacunas. Bovinos.

INTRODUÇÃO

Por a sua grande capacidade migratória, fagocítica e bactericida, os neutrófilos são usualmente denominados soldados de defesa do organismo. Quando estimulados por mediadores inflamatórios, os neutrófilos sofrem uma grande ativação de seu metabolismo oxidativo, a denominada “explosão respiratória”, que resulta num intenso consumo celular de energia e oxigênio, gerando substâncias oxidantes com alto poder bactericida, viricida e fungicida, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (CASIMIR e TEAHAN, 1994, ZINKL e KABBUR, 1997). O NBT é um corante supravital amarelo-claro, que se transforma em formazan, cuja coloração é azul-escura, mediante sua redução pelo superóxido produzido pelo metabolismo oxidativo dos neutrófilos (MILLER e KAPLAN, 1970). O princípio do teste de NBT baseia-se no fato de que esse superóxido, por redução, transforma o tetrazólio incolor em formazan, que pode ser visualizado dentro do citoplasma de neutrófilos reductores pela microscopia ótica (PARK e GOOD, 1970).

Em 1977, Sara e Dwaraknath realizaram o teste de redução do NBT em bovinos e constataram que a porcentagem de neutrófilos NBT-reductores de 20 fêmeas da espécie bovina, clinicamente sadias, variou entre 2 e 5 %. Costa e Kohayagawa (2000) determinaram que, em bovinos da raça Nelore, a porcentagem média de neutrófilos reductores de NBT na prova não estimulada e estimulada é de 6 e 12, respectivamente. Já Couto et. al. (2001) observaram que em bovinos sadios a porcentagem média de neutrófilos reductores de NBT para a prova não estimulada foi de 2,03%.

Alguns trabalhos, realizados em outras espécies que não a bovina, têm demonstrado interferência das diversas práticas de vacinação no teste de redução do NBT. Em camundongos vacinados com *Plasmodium yoelli* e *Plasmodium chabaudi* (DOCKRELL et al., 1986), em ovelhas vacinadas com *Listeria atenuada* (NOWACKI et al., 1991) e em peixes (MUNOZ et al., 2000) foi observado

que a porcentagem de neutrófilos reductores de NBT aumentou logo em seguida à vacinação.

Por outro lado, o trabalho realizado por Gallego e Lapena (1990) em caprinos vacinados e inoculados experimentalmente com *Brucella melitensis* não mostrou qualquer influência pós-vacinação sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Avdeeva et al. (1993) constataram que, após a vacinação de humanos contra a leptospirose, os valores de neutrófilos reductores de NBT diminuíram. Deptula e Gorecka-Odkaza (1994) também verificaram um efeito inibidor sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em coelhos imunizados com *C. psittaci* inativada.

Embora na espécie bovina seja muito comum a prática de vacinação a fim de garantir a imunidade dos rebanhos, não há na literatura estudos que relatam a influência das vacinas no teste de redução do NBT em bovinos. Considerando o provável estímulo das vacinações sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e, como consequência, sobre os testes laboratoriais que avaliam esse metabolismo, o presente trabalho visa contribuir para melhor interpretação do teste de redução do NBT em bovinos, avaliando o efeito da vacina contra brucelose bovina sobre esse teste.

MATERIAL E MÉTODOS

Após um exame físico geral, conforme preconizado por Feitosa (2004), foram selecionadas 13 fêmeas da raça Holandesa, com nove meses de idade, consideradas clinicamente sadias e que apresentaram valores do leucograma e fibrinogênio plasmático normais. As novilhas receberam uma única dose da vacina contra brucelose bovina, amostra B19⁶, por via subcutânea. Utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 8 mm próprias para tubos com vácuo, de cada animal, colheram-se 10 mL de sangue antes da aplicação da vacina, um dia, 15 e 30 dias após a vacinação, dos quais 0,5 mL foi

aconicionados em frascos plásticos estéreis contendo 10 U de heparina sódica², a fim de realizar o teste de redução do NBT, e outro 0,5 mL de sangue foram acondicionado em frasco de plástico contendo 5 mg de EDTA-sódico, com fins de realizar o leucograma e a determinação da concentração plasmática de fibrinogênio. As amostras sanguíneas foram mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial.

Teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT):

Os testes de redução espontânea e estimulada do NBT foram realizados pelo método citoquímico descrito por Park et al. (1968), modificado por Ciarlini (1998): Reconstituem-se frascos contendo 1mg de tetrazólio nitroazul (NBT) tamponado⁷ com 1.000mL de água destilada. Utilizando-se uma pipeta automática, transferiram-se 25mL da solução de NBT para dois frascos tipo "Eppendorf", identificados com o número das amostras e as letras NE, destinado ao teste não-estimulado, e E, destinado ao teste estimulado, no qual adicionaram-se 2,5 mL de estimulante⁸ constituído de extrato bacteriano inativado. Utilizando-se pipetas com ponteiros plásticas, adicionaram-se 2,5 mL de sangue heparinizado e homogeneizado nos frasco NE e E. Após a mistura do sangue heparinizado aos reagentes, incubaram-se os frascos a 37°C por 10 minutos em banho-maria e à temperatura ambiente por outros 10 minutos. Utilizando-se lâminas limpas e desengorduradas com álcool e éter, prepararam-se dois esfregaços com o conteúdo de cada um dos frascos. Após secagem, os esfregaços foram corados com corante hematológico panótico rápido comercial⁹. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos. Considerou-se o neutrófilo reativo aquele que apresentasse qualquer grânulo intracitoplasmático de cor azul a negro.

Leucograma:

A contagem total de leucócitos foi realizada manualmente utilizando-se câmara de Neubauer e líquido diluidor de Türk. A contagem diferencial de 100 leucócitos foi feita em esfregaços sanguíneos tingidos com corante hematológico panótico rápido comercial⁴, segundo as recomendações e os critérios de Jain (1986).

Concentração do fibrinogênio plasmático:

A concentração de fibrinogênio plasmático foi determinada pelo método indireto de precipitação pelo calor (56 - 58o C) e com leitura feita em refratômetro¹⁰, conforme preconizado por Jain (1986).

Determinação de anticorpos para brucelose:

A determinação de anticorpos para brucelose foi feita pelo método de soroprecipitação rápida - prova de Huddleson utilizando-se antígeno¹¹,

conforme preconizado por Corrêa e Corrêa (1992).

Análises estatísticas

Para todas as análises, nos quatro diferentes momentos experimentais (M0, M1, M2 e M3), foram determinadas as médias e as medianas como medidas de tendência central e as amplitudes, desvios-padrão e os coeficientes de variação, como medidas de dispersão.

Após o estudo da distribuição das variáveis quanto à normalidade e homocedasticidade, conforme preconizado por ZAR (1984), para a comparação entre os momentos experimentais, foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman e de Dunn. Para a verificação da correlação, foi utilizado o teste de Spearman. As análises estatísticas supracitadas foram realizadas por um programa estatístico¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os títulos de anticorpos para brucelose 15 e 30 dias após a vacinação foram significativamente superiores aos obtidos nos demais momentos (Tabela 1). Segundo Corrêa e Corrêa (1992), a IgM, produzida decorrente da vacinação, baixa em 30 dias aproximadamente. Entretanto, deve ser considerado que o teste de soroprecipitação rápida é inespecífico, detectando a IgM oriunda de outros estímulos, além do vacinal (TIZARD, 2002).

Allen et al. (1996) descreveram um aumento do número total de leucócitos e do número absoluto de neutrófilos logo após a vacinação em bezerros. No presente estudo, um dia após a vacinação, os animais apresentaram aumento significativo dos valores de leucócitos totais ($p = 0,006$) e de neutrófilos absolutos ($p < 0,0001$), entretanto para o número de linfócitos absolutos não houve diferença significativa entre os momentos (Tabela 2), à semelhança das observações feitas por outros autores (ALLEN et al., 1996). Acreditamos que leucocitose por neutrofilia no primeiro dia experimental está relacionada ao processo febril observado logo após a vacinação.

Os valores médios das porcentagens de neutrófilos redutores de NBT antes da vacinação foram semelhantes aos observados por Couto et al. (2001), porém inferiores aos obtidos por Sara e Dwaraknath (1977) e por Costa e Kohayagawa (2000) para bovinos sadios (Tabela 1). No

¹ Brucel-Vet, Biovet, São Paulo - Brasil.

² NBT Vial, Catalog n.º 840-10, SIGMA DIAGNOSTICS® St. Louis, USA.

³ STIMULANT, Catalog n.º 840-15, SIGMA DIAGNOSTICS® St. Louis, USA.

⁴ Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.

⁵ Refratometre ATAGO SPR-T2, ATAGO Co., LTD, Japan.

⁶ Antígeno para diagnóstico rápido de brucelose, Instituto Biológico - Secretaria de Agricultura e Abastecimento - São Paulo, Brasil.

⁷ SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

Tabela 1 - Resumo da análise estatística dos valores de neutrófilos redutores do NBT na prova não estimulada (NBT-NE) e estimulada (NBT-E) e da titulação da reação de soroaglutinação rápida em novilhas da raça Holandesa antes e após imunização com *Brucella abortus* - amostra B19.

	Dias Pós Vacinação	Média	Mediana	Desvio Padrão
NBT - NE	0	0,3	0 a	0,6
	1	0,9	1,0 a	1,0
	15	0,6	0 a	0,9
	30	1,0	1,0 a	1,2
NBT - E	0	1,2	0 a	2,0
	1	3,4	3,0 b	2,5
	15	2,3	2,0 ab	2,0
	30	3,0	3,0 ab	1,5
TÍTULO	0	0	0 a	0
	1	0	0 a	0
	15	361,5	200 b	272,5
	30	96,2	100 b	55,8

* Letras não coincidentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Resumo da análise estatística dos valores de fibrinogênio plasmático, contagem total e diferencial de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos de novilhas da raça Holandesa antes e após imunização com *Brucella abortus* - amostra B19.

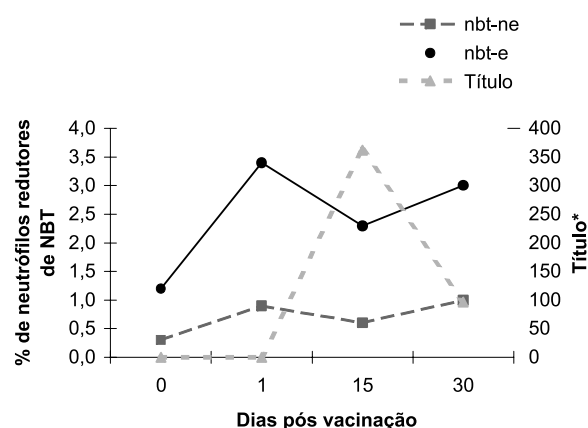
	Dias após a vacinação	Média	Mediana	Desvio Padrão
Fibrinogênio g/L	0	40,0	40,0 a	10,0
	1	50,0	50,0 ab	10,0
	15	30,0	30,0 a	20,0
	30	70,0	70,0 b	20,0
Leucócitos totais $\times 10^9 / L$	0	15,8	15,3 ab	3,5
	1	21,5	21,9 a	3,7
	15	14,2	11,9 ab	4,3
	30	13,4	14,0 b	3,4
Neutrófilos $\times 10^9 / L$	0	3,1	2,8 a	1,2
	1	8,3	8,0 b	2,5
	15	3,1	3,4 a	1,7
	30	2,2	2,0 a	0,9
Eosinófilos $\times 10^9 / L$	0	0,5	0,4 a	0,6
	1	0,6	0,3 a	0,8
	15	0,6	0,6 a	0,4
	30	0,5	0,4 a	0,4
Basófilos $\times 10^9 / L$	0	0,2	0,1 a	0,2
	1	0,1	0 a	0,1
	15	0	0 a	0,1
	30	0	0 a	0
Linfócitos $\times 10^9 / L$	0	11,5	10,3 a	3,3
	1	8,3	8,0 a	2,5
	15	10,1	9,1 a	3,4
	30	10,1	9,6 a	3,3
Monócitos $\times 10^9 / L$	0	0,5	0,4 a	0,5
	1	0,3	0,3 a	0,4
	15	0,2	0,2 a	0,2
	30	0,5	0,3 a	0,4

* Letras não coincidentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

presente estudo, a variação do número de neutrófilos reativos ao NBT no momento pré-vacinal esteve entre 0 e 2%, enquanto que os valores descritos por Sara e Dwaraknath (1977) variaram de 2 a 5%. Os valores de Costa e Kohayagawa (2000) tiveram média de 6% para a prova não estimulada e 12% para a prova estimulada, enquanto no presente trabalho as médias de neutrófilos redutores de NBT para o M0 foram de 0,3% para a prova não estimulada e 0,8% para a prova estimulada. Tal diferença deve-se provavelmente ao fato de o tempo de incubação e de os critérios de leitura das reações de redução do NBT utilizados no presente trabalho não serem os mesmos adotados por Costa e Kohayagawa (2000) e Sara e Dwaraknath (1977). Couto et al. (2001) observaram que a porcentagem média de neutrófilos redutores de NBT para a prova não estimulada foi de 2,03% para o animais sadios.

Decorridos 15 dias após a vacinação, houve um declínio da porcentagem de células redutoras de NBT no teste não estimulado, coincidindo com o pico de produção de anticorpos frente a uma primo vacinação (Figura 1). Avdeeva et al. (1993) também observaram uma diminuição da capacidade de os neutrófilos reduzirem o NBT em humanos vacinados contra leptospirose.

Em outras espécies que não a bovina (DOCKRELL et al., 1986, NOWACKI et al., 1991, MUNOZ et al., 2000) foi observado que a porcentagem de neutrófilos redutores de NBT aumenta em seguida à vacinação. No presente estudo não foi verificada interferência da vacina contra brucelose na prova não estimulada de redução do NBT, concordando com as observações feitas anteriormente nos estudos de Gallego e Lapena (1990).



* Diluição que apresentou aglutinação completa

Figura 1 - Valores médios da porcentagem de neutrófilos de bovinos redutores de NBT nas provas não estimulada (nbt-ne) e estimulada (nbt-e) e dos títulos obtidos pela prova de soroaglutinação rápida para brucelose, antes e após imunização com vacina *Brucella abortus* - amostra B19.

Já para a prova estimulada, observou-se um aumento significativo ($p = 0,02$) da porcentagem de neutrófilos redutores de NBT após um dia da vacinação (Tabela 1). Esse aumento de redução de NBT na prova estimulada coincidiu com a reação vacinal que ocorreu nas primeiras horas pós-vacinação. A maioria dos animais apresentou nesse período um quadro febril e edema no local da aplicação da vacina. O aumento da concentração plasmática de fibrinogênio em M1 coincidiu com a elevação do número de neutrófilos redutores do NBT na prova estimulada, entretanto 30 dias após a vacinação observou-se uma elevação maior desta proteína (Figura 2) sem que houvesse um aumento significativo de redução do NBT (Tabela 1). As variações da taxa de fibrinogênio plasmático e do título de anticorpos para *Brucella* após a vacinação não apresentaram correlação significativa com o teste estimulado do NBT (Tabela 2). Deve-se considerar que durante esse período, além do fibrinogênio, a elevação de outras proteínas de fase aguda (proteína C reativa, ceruloplasmina, haptoglobina etc) pode tornar o neutrófilo mais sensível à ativação induzida pelo estímulo “in vitro” da prova estimulada (NBT-E), o que explicaria os valores mais elevados de NBT-E um dia após a vacinação.

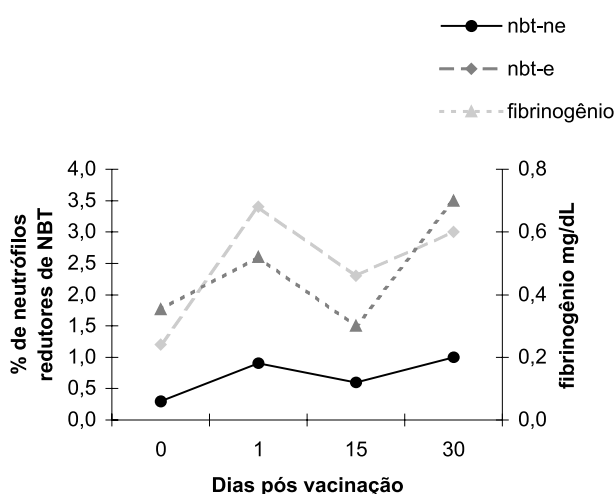


Figura 2 - Valores médios da porcentagem de neutrófilos de bovinos redutores de NBT nas provas não estimulada (nbt-ne) e estimulada (nbt-e) e da concentração plasmática de fibrinogênio, antes e após imunização com vacina *Brucella abortus* - amostra B19.

CONCLUSÃO

- O metabolismo oxidativo dos neutrófilos avaliado pelo teste de redução espontânea do NBT não sofre a influência da aplicação de vacina para *Brucella abortus* em novilhas da raça Holandesa.

- O metabolismo oxidativo dos neutrófilos avaliado pelo teste estimulado de redução espontânea do NBT é influenciado pela aplicação de vacina para *Brucella abortus* em novilhas da raça Holandesa.

ARTIGO RECEBIDO: Junho / 2004
APROVADO: Setembro / 2004

REFERÊNCIAS

ALLEN, L. J., KABBUR, M. B., CULLOR, J. S., GARDNER, I. A., STOTT, J. L., GEORGE, L. W. Alterations in blood lymphocyte subpopulations and hematologic values in neonatal calves after administration of a combination of multiple-antigen vaccines. **Journal American of Veterinary Medicine Association**, v. 209, p. 638-42, 1996.

AVDEEVA, M. G., MEL'NIK, G. V., LEBEDEV, V. V., SHUBICH, M. G. Prognostic significance of the NBT test in patients with ichterohaemorrhagic leptospirosis. **Klinicheskaia laboratornaia diagnostika**, v.4, p.22-25, 1993.

CASIMIR, C.M., TEAHAN, C.G. The respiratory burst of neutrophils and its deficiency. In: HELLEWELL, P. G., WILLIAMS, T. J. **Immunopharmacology of neutrophils**. London: Academic Press, 1994. p 27-54.

CIARLINI, P.C. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em ovelhas (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais ao final da gestação, durante a lactação e após o desmame: influência de fatores raciais e hormonais. Botucatu, SP. 1998. 201 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CORRÊA, W. M., CORRÊA, C. N. M. Bruceloses In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1992. cap. 20, p. 203.

COSTA, J. N., KOHAYAGAWA, A. Metabolismo oxidativo de neutrófilos de vacas da raça nelore (*Bos Indicus*). **Brazilian Journal of Veterinarian Science**, v.7, supl., p.128, 2000.

COUTO, R., PESTANA, F. L., PATRÍCIO, R. F., ANTONIO, D. A., NASCIMENTO, F., FEITOSA, F. L. F., CIARLINI, P. C. Uso clínico do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) na avaliação dos processos inflamatórios de bovinos e suas correlações com os valores do fibrinogênio plasmático. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, Salvador, BA. 2001. **Anais...** p. 228.

- DEPTULA, W., GORECKA-ODKAZA, D. Activity of neutrophilic granulocytes and hematologic picture in rabbits immunized with *Chlamydia psittaci*. **Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia**, v.46, p.207-214, 1994.
- DOCKRELL, H. M., ALAVI, A., PLAYFAIR, J. H. Changes in oxidative burst capacity during murine malaria and effect of vaccination. **Clinical and experimental immunology**, v.66, p.37-43, 1986.
- FEITOSA, F. L. F. Exame físico geral ou de rotina In: ____ **Semiologia: a arte do diagnóstico**. São Paulo, Roca, 2004. cap 4, p. 77-102.
- GALLEGO, M. C., LAPENA, M. A. The interaction of *Brucella melitensis* 16-M and caprine polymorphonuclear leukocytes. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.13, p.59-65, 1990.
- JAIN, N.C. Hematologic techniques. In: SCHALM, O. M. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1986. chap. 2, p.20-86.
- MILLER, D.R., KAPLAN, H.G. Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. **Pediatrics**. v.45, p.861-5, 1970.
- MUNOZ, P., SITTA-BOBADILLA, A., ALVAREZ-PELLITERO, P. Celular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. *Teleostei Serranidae*) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). **Parasitology**, v.120, p.465-477, 2000.
- NOWACKI, J., KLIMENTOWSKI, S., LEWANDOWSKA, S. Immunogenic and protective properties of an attenuated vaccine against listeriosis in pregnant sheep and their offspring. **Medycyna Weterynaryjna**, v.46, p. 259-261, 1991.
- PARK, B.H., FIKRIG, S.M., SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. **Lancet**, v.2, p.532-4, 1968.
- PARK, B.H., GOOD, R.A. NBT test stimulated. **Lancet**, v.2, p.616, 1970.
- SARA, I. S., DWARAKNATH, P.K. A note on nitroblue tetrazolium test in normal and diseased animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.47, p.362-4, 1977.
- TIZARD, I. R. Vacinação e Vacinas In: ____ **Imunologia veterinária**. 6. ed., São Paulo: Roca, 2002. cap. 21, p. 265.
- ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718 p.
- ZINKL, J. G., KABBUR, M.B. Neutrophil function. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5thed. San Diego: Academic Press, 1997. chap. 11, p. 285-302.