



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

SOROPREVALÊNCIA DA BRUCELOSE EM  
CRIATÓRIOS DE SUÍNOS NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL.

LUCIANA LANA RIGUEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA / DF

MARÇO / 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

SOROPREVALÊNCIA DA BRUCELOSE EM  
CRIATÓRIOS DE SUÍNOS NO DISTRITO FEDERAL,  
BRASIL.

LUCIANA LANA RIGUEIRA

ORIENTADOR: SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 139 / 2017

BRASÍLIA/DF

MARÇO /2017

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RIGUEIRA, L. L. **Soroprevalência da brucelose em criatório de suínos no Distrito Federal, Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, (7q) p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

RIGUEIRA, LUCIANA LANA  
Soroprevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal, Brasil. / LUCIANA LANA RIGUEIRA; orientador SIMONE PERECMANIS. -- Brasília, 2017.  
72 p.  
Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, 2017.  
1. BRUCELOSE. 2. SUÍNOS. 3. DISTRITO FEDERAL .  
4. BRASIL. I. PERECMANIS, SIMONE, orient. II. DOUTORA.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

## SOROPREVALÊNCIA DA BRUCELOSE EM CRIATÓRIOS DE SUÍNOS NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.

LUCIANA LANA RIGUEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL  
COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR

SIMONE PERECMANIS, Profa. Dra. (UnB)  
(ORIENTADORA)

ANGELA PATRÍCIA SANTANA, Profa. Dra. (UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

JORGE CAETANO JÚNIOR, Doutor.  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 21 DE MARÇO DE 2017.

## DEDICATÓRIA

*Para Fábio, Aline e Mateus. Simplesmente por serem a minha razão de seguir em frente e buscar sempre mais!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Dra. Simone Peregmanis, pela orientação e ensinamentos essenciais, os quais fizeram me apaixonar ainda mais pela Medicina Veterinária, minha profissão por vocação.

Demonstro meu reconhecimento ao subsecretário de Defesa e Vigilância Agropecuária do DF, Lucílio Antônio Ribeiro por permitir e incentivar a realização do mestrado. Aos analistas Daniel Buso e Marisa Araújo, por se disporem a me ajudar do início à conclusão desta pesquisa. E aos meus colegas da base do Gama por darem vida à nossa rotina de trabalho.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, representado pelos fiscais agropecuários, Luiz Cláudio Coelho e Paulo Martins Soares Filho, com papel relevante nas autorizações e por proporcionarem celeridade ao andamento das atividades.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, em especial à diretora Fernanda Simioni Freitas, pela doação dos frascos de antígeno prova lenta e pela eficiência e atenção ao serviço de defesa agropecuária.

Agradeço aos professores Ângela Patrícia Santana e Jorge Caetano Júnior por participarem da banca examinadora e ao professor Vitor Salvador Picão Gonçalves à Ana Lourdes pela orientação na análise estatística.

À querida veterinária Luciana Lobo, que tive o prazer de conhecer, trabalhar e publicar! Ao meu amigo de turma e hoje professor da UFV, Abelardo Silva Jr, que tanto me orgulha em sua trajetória de sucesso. Thank you a lot for the review, Abelliot!

Agradeço pela minha família não só em Brasília, mas também em Minas, em São Paulo, em Goiás e no Rio de Janeiro: um pedacinho de mim, em um ponto diferente do Brasil e mesmo distante sempre teve grande participação em minhas conquistas.

*“Plante em torno de você as sementes do  
otimismo e bondade para que possa colher  
amanhã os frutos do amor e da felicidade. ”*

*(Minutos de Sabedoria)*

## RESUMO

A brucelose acomete múltiplas espécies animais, inclusive o homem, em diversas partes do mundo. A doença é responsável por perdas econômicas, principalmente pela queda na eficiência reprodutiva. O tratamento em animais não é permitido no Brasil e o sacrifício sanitário de reagentes positivos é obrigatório. Criatórios de subsistência de suínos apresentam alta vulnerabilidade à entrada de patógenos e, estes animais, ao se infectarem, podem tornar-se reservatórios. Ainda não existem vacinas eficientes que confirmam biossegurança adequada em suínos e não se exige atestado negativo para brucelose em criatórios. Portanto, ações de vigilância ativa se fazem necessárias para o controle da doença. Este estudo teve o objetivo de estimar a soroprevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal. Foram analisadas 1.793 amostras de soro de suínos de 823 criatórios colhidas em duplicata durante o inquérito epidemiológico delineado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para monitoramento de Peste Suína Clássica em área livre em 2011, 2012 e 2014. Em 2011, a frequência foi de 0,47% (0,01 – 2,62). Apesar da ausência de resultados positivos em 2012 e 2014, é possível afirmar com 97,5% de confiança, que em 2012, a frequência da doença esteve abaixo de 1,1% e, em 2014, abaixo de 1,2%, levando em consideração o tamanho da amostra estudada. Esse estudo demonstra que a frequência da *Brucella sp.* ocorre em níveis baixos em rebanhos suínos no Distrito Federal.

## ABSTRACT

*Brucellae* infections have been documented world-wide over the years in a great variety of species, including humans. Brucellosis causes economic losses due to reproductive failures. Treatment is not allowed and sick animals should be sacrificed. Small pig farms have low biosecurity and are vulnerability to pathogenic microorganisms. Household pigs can be infected and become reservoirs. There is no vaccine without side effects which is available for swines and negative exams are not requested for small pig farms. Thus, active surveillance is needed using serological methods in order to control the disease. This research evaluated swine brucellosis in household farms in Federal District. It was screening 1793 pigs from 823 small farms during the epidemiological study in 2011, 2012 and 2014 sampled by Ministry of Agriculture. In 2011 the occurrence of frequency for brucellosis was 0.47% (0.01 – 2.62). In 2012 and 2014, despite of none positive results, if the disease was present in pig herds, with the confidence interval 97,5%, the occurrence of the disease had to be below of 1,1% of frequency in 2012 and 1,2% in 2014, regarding the sample size of this study. This work shows about *Brucella* circulates at low level occurrence among swine from herds at central region, Brazil. Because of the low brucellosis occurrence, it was not possible to evaluate the risk factors involved they might influence on the disease perpetuation. It is believed that the Federal District count on a suitable animal health surveillance system and the preventive measures included in the brucellosis national program as the sanitary reproductive swine controls are essential to keep low level of the disease occurrence.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1:</b> Número de criatórios e de suínos adultos por ano .....	61
<b>Tabela 2:</b> Prevalência da brucelose em criatórios suínos por ano de estudo.....	62

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>FIGURA 1</b> Multiplicação da Brucella no interior do macrófago, modelo Vir-B dependente. .....	10
---	----

### CAPÍTULO II

<b>FIGURA 2</b> Criatórios de suínos amostrados no estudo de 2011 .....	65
<b>FIGURA 3</b> Criatórios de suínos amostrados no estudo de 2012 .....	66
<b>FIGURA 4</b> Criatórios de suínos amostrados no estudo de 2014 .....	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- AAT: Teste sorológico Antígeno Acidificado Tamponado
- ELISA – ensaio imunoenzimático, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*
- FC: Fixação de complemento
- IgG – imunoglobulina do tipo G
- IgM – imunoglobulina do tipo M
- IL-1 – interleucina-1
- IL-6 – interleucina-6
- IFN- $\gamma$  – interferon gama
- LPS-O - lipolissacarídeo-O, presente na membrana externa das gram-negativas (antígeno O)
- MALDI-TOF – espectrometria de massa aplicada na classificação e identificação de microorganismos, do inglês *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*)
- MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
- PNCBET – Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
- PNSS – Programa Nacional de Sanidade Suína
- PSC – Peste Suína Clássica
- PCR-RFLP – Reação em cadeia da polimerase - restrita a análise do polimorfismo em fragmentos.
- RB51 – Cepa vacinal *Brucella abortus* rugosa
- REV1 – Cepa vacinal *Brucella melitensis*
- SB19 – Cepa vacinal *Brucella abortus* lisa
- S2 - Cepa vacinal *Brucella suis*
- SAT: Teste sorológico Soroaglutinação lenta em tubos
- SEAGRI- DF: Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural doDF
- °C – graus Celsius
- 2ME: Teste sorológico confirmatório 2 Mercapto-etanol

# Sumário

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Características da Brucela.....	4
2.3 Mecanismos Virulentos.....	6
2.4 Patogenia.....	9
2.5 Epidemiologia.....	12
2.5.1 Brucelose em animais domésticos e silvestres.....	13
2.5.2 Brucelose em suínos.....	14
2.5.3 Brucelose em humanos.....	16
2.6 Testes diagnósticos.....	17
2.6.1 Bacteriológicos.....	17
2.6.2 Moleculares.....	18
2.6.3 Sorológicos.....	19
2.7 Controle e Prevenção.....	23
2.7.1 Educação Sanitária.....	25
2.7.2 Vacinas no contexto da brucelose.....	26
2.7.3 OIE.....	29
2.7.4 PNCBET.....	30
2.7.5 PNSS.....	31
2.7.6 Criatórios de Suínos.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Geral:.....	34
3.2 Específicos:.....	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II.....	51
ARTIGO CIENTÍFICO.....	51
RESUMO.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAIS e METÓDO.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	64
A - Protocolo AAT.....	64
B - Protocolo SAL/2-ME.....	67
C - Formulário de Colheita de Amostras.....	72

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

O controle das doenças infectocontagiosas que acometem o homem e os animais representa um desafio contínuo para instituições públicas, privadas e não governamentais. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) lista inúmeras doenças que devem atender processos estabelecidos de notificação, cujos casos confirmados devem ser reportados com o objetivo de proporcionar transparência no cenário internacional.

As doenças submetidas ao monitoramento, assim como os status sanitários dos respectivos estados-membros, sofrem revisões periódicas com a aprovação dos 180 representantes dos países membros, durante a Assembleia Mundial dos Delegados da OIE. A lista atualizada em 2017, após o 84º encontro, em 22 a 26 de maio de 2016 em Paris, estabeleceu princípios de controle e notificação obrigatória de 116 afecções que devem ser mantidas sob vigilância no âmbito dos serviços veterinários nacionais conforme publicações nos códigos sanitários de animais aquáticos e terrestres. Nesse contexto, focos de infecções por *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* devem ser reportados (OIE, 2016).

A brucelose, responsável por perdas econômicas, principalmente decorrentes da redução da eficiência reprodutiva (Czibener et al., 2016), é classificada no grupo de doenças que afetam múltiplas espécies. Apesar de ser a zoonose com a mais ampla disseminação no mundo (Welburn et al., 2015), a brucelose é negligenciada em humanos (Adone & Pasquali, 2013) e está inserida no grupo das sete doenças que mais contribuem para manutenção e perpetuação da miséria (González et al., 2008).

A brucelose é endêmica em diversos países e regiões, com prevalências consideradas de moderada a alta na região do Mediterrâneo (Cloeckaert et al., 2001), Oriente Médio (Refai, 2002; Blasco & Molina-Flores, 2011; McDermott et al., 2013), Índia (Renukaradya et al., 2002), Mongólia (Zinsstag et al., 2007), China (Zhu et al., 2016), Rússia (Zheludkov & Tsirelson, 2009), África (McDermott & Arimi, 2002; Mekonnen et al., 2010) e América Latina (Baumgarten, 2002; Moreno, 2002; Vargas, 2002; Ortegón et al., 2003; García-Juárez et al., 2014). A doença é ausente no Canadá, parte da Europa, Japão, Nova Zelândia e Israel (Seleem et al., 2010). Entretanto, mesmo em países, como Austrália (Ridoutt et al., 2014) e Estados Unidos (Stoffregen, 2007; Ramamoorthy, 2011) e em regiões, como a Europa (Köppel et al., 2007), que já alcançaram a erradicação nas espécies domésticas, a manutenção da brucelose em animais selvagens gera preocupações (Sandfoss et al., 2012).

No Brasil, o tratamento em animais não é permitido e o sacrifício sanitário é obrigatório (BRASIL, 2006). A terapêutica requer associação de antibióticos que possuem uso comum em humanos, por períodos prolongados -seis semanas ou mais- o que inviabilizaria economicamente a sua aplicação em animais de produção, como na suinocultura (Dieste-Pérez et al., 2014). No Brasil, já foram realizados estudos epidemiológicos da brucelose em bovinos (Poletto et al., 2004; Dias et al., 2009; Ogata et al., 2009), ovinos (Araújo et al., 2013) e em suínos (Filippsen et al., 2001; Silva et al., 2009; Braga et al., 2013; Leite et al., 2014). Há relatos de infecções cruzadas entre espécies (Samartino, 2002; Fretin et al., 2013).

Apesar de a brucelose estar presente em rebanhos bovinos e suínos, a política sanitária governamental brasileira preconiza medidas e controle de brucelose aplicadas à espécie bovina, respaldadas no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose - PNCBET (Brasil, 2016). Entretanto, em programas que concentraram a vigilância apenas em bovinos, como na Itália (Pilo et al.; 2015), constatou-se focos da brucelose em suínos domésticos, evidenciando a necessidade de controlar a doença também nesta última espécie.

Dessa forma, criatórios de suínos que apresentam alta vulnerabilidade à entrada de patógenos podem exercer papel de disseminadores da brucelose não apenas para suínos, mas também para outras espécies. Portanto, é fundamental o conhecimento da situação epidemiológica nestes criatórios com a finalidade de avaliar a necessidade ou não da adoção de novas medidas de controle a serem abordadas no programa nacional de controle e erradicação desta doença.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico

A brucelose foi descrita, pela primeira vez, em 1859, por Marston e ficou conhecida como Febre Ondulante, Febre do Mediterrâneo ou Febre de Malta (Zammit, 1905). O agente infeccioso, considerado então como *Micrococcus melitensis*, foi isolado por David Bruce em 1887, do baço de militares que haviam ingerido leite de cabra cru na ilha de Malta (Memisoglu et al., 2008).

Bernard Bang (1897), um veterinário dinamarquês, classificou a bactéria extraída de amostras de feto de bovino, como *Bacillus abortus* (Bacilus de Bang). Posteriormente, Good & Smith (1913) extraíram uma bactéria de tecidos de suínos com as mesmas características biológicas e de cultura que o *Bacillus abortus*, mas observaram algumas características que o diferenciavam do bacilo de Bang e realizaram experimentos inoculando a bactéria em suínos. No ano seguinte, Jacob Traum atribuiu à mesma bactéria a causa da infecção que provocava abortamento em suínos (Aleixo et al.; 1999). Em 1929, Hiddleston isolou o mesmo agente e classificou-o como *Brucella suis*.

Até 1984, seis espécies distintas já haviam sido classificadas pelo Comitê de Taxonomia - *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* e *B. neotomae*. Entretanto, em 1985 julgou-se conveniente alterar a taxonomia da Brucela, e o gênero passou a incluir, então, uma única espécie: *Brucella melitensis* e as outras cepas, consideradas até 1984 como espécies, seriam consideradas biovares (Corbel, 1988; Xavier et al., 2009). Tal justificativa respaldou-se em estudos do genoma da brucela que sugeriam homologia genética para todas as espécies (Verger et al., 1998; Moreno et al., 2002).

Mas partir de novas técnicas diagnósticas foi possível a caracterização de estruturas moleculares que distinguiram entre as cepas de brucelas, constituindo de elementos suficientes para classificá-las em espécies distintas (Godfroid et al., 2011; Goodwin & Pascual, 2016). Nesse sentido, Ross et al. (1994) e Ewalt et al. (1994), influenciaram o Comitê de Taxonomia a reclassificar, em 2003, os critérios para a definição de espécies, retomando a classificação da nomenclatura aprovada em 1984 e incluindo novas espécies que causavam infecção em mamíferos aquáticos (Osterman & Moriyon 2006).

Portanto, graças aos avanços das técnicas moleculares, uso de proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e sequenciamento de genes, novos marcadores de membrana hospedeiro-específicos foram identificados, propondo a classificação de novas espécies e biovares (Cloeckaert et al., 2002a).

## 2.2 Características da Brucela

*Brucella* são cocobacilos gram-negativos (Kaur et al., 2015), com diâmetro aproximado de 0,7 a 0,5  $\mu\text{m}$ , imóveis, aeróbicos ou microaerofílicos, não esporulados, positivos para urease e catalase (Foster et al., 2007). As propriedades moleculares, características bioquímicas e metabólicas tais como: epítomos específicos, requerimento de  $\text{CO}_2$ , crescimento no meio de Farrells e atividade metabólica da galactose, diferem entre as espécies (Foster et al., 2002; Godfroid, 2011). São classificados como micro-organismos intracelulares facultativos (Corbel, 1997), mas Roop et al. (2009) sugere que seria mais conveniente denominá-los como facultativos extracelulares, por fazer das células de mamíferos sua residência permanente.

As espécies de brucela são classificadas quanto ao fenótipo morfológico de suas colônias em lisas e rugosas. Passagens sucessivas em meio de cultura favorecem a transformação espontânea do fenótipo morfológico liso para o fenótipo rugoso (Ugalde et al, 2000), cujo fenômeno está relacionado à redução de patogenicidade (Allen et al., 1998). Dessa forma, as que exibem fenótipo liso divergem quanto à estimulação do sistema imune, invasão da célula e tráfico intracelular.

*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* e as respectivas cepas vacinais: *B19*, *Rev1*, *S2*; apresentam morfologia lisa. *B. neotomae*, *B. microti*, *B. pinnipedialis* e *B. ceti* também expressam fenótipo liso. Enquanto que *B. ovis*, *B. canis*, e as cepas vacinais *B. abortus RB51*, *B. melitensis B115*, são fenotipicamente rugosas (Foster et al., 2007).

A codificação de proteínas não funcionais ou mutações que impliquem no bloqueio da expressão do gene podem estar relacionadas às diferenças de fenótipos (Zygmunt et al., 2009). Essas mutações comprometem as funções das proteínas da membrana externa (Cloeckert et al., 2002a) e enzimas como a fosfoglucomutase (pmg), presente em reações biossintéticas que requererem glicose (Ugalde et al., 2003) e a perosamino sintetase (Wbk), envolvida nas reações de catalisação e conversão para a polimerização da cadeia O (Zinsstag et al., 2007).

O fenótipo liso é caracterizado pela presença do "LPS-O", um prolongamento da membrana externa das bactérias Gram-negativas constituído de lipídeo e polissacarídeo (Ganesh et al., 2014). As cepas lisas carregam o lipolissacarídeo-O (LPS-O) completo e as

cepas rugosas não possuem a cadeia longa distal do polissacarídeo O, caracterizado como antígeno O (Ruiz et al., 2006).

A molécula LPS-O é dividida em 3 partes: lipídio A; núcleo oligossacarídeo constante; e a cadeia variável do polissacarídeo O. A cadeia distal O é um homopolímero de N-formolperosamino (Adone et al, 2011), formado em sua maior parte por manose, enquanto que o núcleo constante é composto primariamente de glicose (McQuiston et al., 1999). A cadeia polissacarídica é um homopolímero de perosamina (4,6-dideoxi-4-formamido-D-mannopiranosil), o qual apresenta configurações divergentes estabelecidas pelas ligações de carbono, caracterizando o antígeno O como tipo A ou tipo M. O antígeno tipo A é representado por 1,2- perosamino, enquanto que o antígeno tipo M por 1,3- perosamino. A distribuição desses determinantes antigênicos implica na resposta humoral específica e auxilia na diferenciação das infecções (Ganesh et al., 2014). A *Brucella suis* apresenta ambas configurações, já, a *B. abortus*, cepa 2308, expressa quase que exclusivamente o antígeno A e a *B. melitensis*, cepa 16M, expressa basicamente o antígeno M (Fernandez-Prada et al, 2001).

Comparada a outras bactérias patogênicas, as brucelas não apresentam fatores de virulência clássicos, como flagelos, cápsulas, plasmídeos, pili ou exotoxinas. Mas, apesar de não possuírem flagelos, foram identificados genes que codificam flagelos similares ao de *Yersinia enterocolitica* O<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (Letesson et al., 2002). A patogenicidade desta bactéria está relacionada à sua habilidade em sobreviver e de se replicar em diferentes tipos de células, fagocíticas ou não (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005), e em se adaptar às condições adversas do ambiente intracelular. O micro-organismo é capaz de evitar a ativação do sistema imune, tráfegar por caminhos alternativos, resistir aos danos oxidativos e se adaptar à tensão limitada de oxigênio no interior dos macrófagos (Gorvel, 2008).

Whatmore et al. (2007) sugerem que propriedades metabólicas podem exercer grande influência na intensidade da virulência da cepa. As inativações de alguns genes podem desempenhar um papel importante na adaptação do parasita para o seu hospedeiro-específico, comprometendo funções de proteínas de membrana e outras reguladoras que irão determinar a permanência da bactéria no organismo (Verger et al., 1998).

Em geral, o cultivo bacteriano, o substrato utilizado e a aplicação de testes bioquímicos auxiliam na caracterização das espécies. *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*, espécies com maior relevância epidemiológica, que são subdivididas em biovars de acordo com a

produção de H<sub>2</sub>S, dependência de CO<sub>2</sub>, sensibilidade ao ressecamento e distribuição de epítomos A ou M (Fernandez-Prada et al., 2001).

As informações metabólicas podem ser suficientes para caracterização das espécies. Lord et al. (1997) diagnosticaram em suínos, na Venezuela, infecção por *B. suis* biovar 1, por meio dos seguintes resultados bioquímicos: produção de H<sub>2</sub>S, aglutinação com anticorpo anti-A, mas ausência de reação com anticorpo anti-M. Portanto, relacionar brucelas aos seus respectivos hospedeiros é essencial para compreender os mecanismos de adaptabilidade ao organismo hospedeiro (Vallat, 2013), uma vez que se identificam variações nos mecanismos virulentos (Foster et al., 2009).

### **2.3 Mecanismos Virulentos**

O lipolissacarídeo “O” (LPS-O) é o mecanismo chave da virulência (Pei & Ficht, 2011) e está diretamente ligado à habilidade de garantir a sobrevivência e a replicação da brucela (Ritting et al., 2003). O comprimento e a configuração da molécula LPS-O influenciam na habilidade do patógeno de se esquivar da atividade bactericida (Fernandez-Prada et al., 2001). A extensa cadeia polissacarídeo “O” atua como uma barreira protetora, impedindo a exposição de proteínas da membrana externa e dificultando o reconhecimento pelas células de defesa (Seleem et al., 2008). Esse retardo na ação da resposta imune cria um intervalo que é crítico para a bactéria invadir a célula hospedeira pelos canais lipídicos do LPS-O reduzindo o efeito endotóxico inerente de micro-organismos invasores (Conde-Álvarez et al., 2012).

Observou-se que a cadeia “O” bloqueia a produção de citocinas em macrófago infectado e postula-se que esse mecanismo seja uma forma do patógeno controlar o sistema de defesa do organismo hospedeiro (Bagues et al., 2004). O LPS-O previne a síntese de mediadores pró-inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (Roop et al., 2009), os quais favorecem atividades microbicidas (Baldwin & Parent, 2002), e a inibição da secreção destes, compromete a ativação do macrófago (Skendros & Boura, 2013). Por outro lado, as cepas rugosas estimulam maior quantidade de quimotoxinas e citocinas (Ritting et al., 2003).

Por intermédio do LPS-O, as funções principais da célula permanecem inalteradas (Köhler et al., 2002). Não há produção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) (Baldwin & Parent, 2002). A apoptose celular não é induzida (Roop II et al., 2009). Assim, o

micro-organismo consegue escapar da ação de células apresentadoras de antígeno, naturalmente estimuladas por fatores que seriam liberados de células mortas (Seleem et al., 2008).

O LPS-O de *Brucella* é conhecido como lipolissacarídeo não-clássico por divergir na atividade biológica endotóxica e na extensão da cadeia polissacarídica (Lapaque *et al.*, 2005). A cadeia O de *B. abortus* varia de 96 a 100 subunidades. Em contraste, a cadeia “O” de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, possui, em média, 40 subunidades (Mc Quiston *et al.*, 1999).

Freer et al., 1995 esclarece que a heterogenidade do LPS está não apenas na cadeia “O”, mas também no núcleo constante do oligossacarídeo e no Lipídio “A”. A estrutura do lipídio “A” é mantida em ambos os fenótipos de brucelas, mas diferenças bioquímicas na estrutura do lipídio ocorrem entre brucelas e outras Gram-negativas. Freer *et al.* (1995) demonstraram que a ligação do lipídio “A” não se desprende da membrana externa das brucelas com técnicas tradicionais de dissociação utilizadas em enterobactérias.

O lipídio “A” favorece o uso de substâncias hidrofóbicas como fonte de energia para a brucela (Gorvel & Moreno, 2002), e esta modifica o metabolismo dos precursores da prostaglandina por meio da indução da síntese de esteróides, direcionando o metabolismo dos nutrientes durante o ciclo de infecção (Lamontagne *et al.*, 2010).

Acredita-se que um dos fatores que contribuem para que as cepas rugosas sejam fagocitadas com mais intensidade é o fato das rugosas serem mais reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro (Ritting *et al.*, 2003). A imunidade inata reconhece antígenos provenientes de marcadores moleculares bacterianos para estimular a resposta inflamatória (Cloekaert *et al.*, 2002a). A concentração máxima de internalização das brucelas lisas nos macrófagos ocorre após 5 minutos do início do processo fagocítico, enquanto que as rugosas continuam sendo englobadas pelas células de defesa atingindo nível máximo após 30 minutos (Pei *et al.*, 2008).

As proteínas da membrana externa exercem papel relevante na imunogenicidade das cepas rugosas por favorecem o reconhecimento pelos macrófagos, mediado pelo sistema complemento (Cloekaert *et al.*, 2002b). O LPS-O limita o ataque do sistema complemento prevenindo a opsonização das cepas lisas (Fernandes-Prada *et al.*, 2001), enquanto que as rugosas são opsonizadas e fagocitadas pela rota comum (Ugalde *et al.*, 2000).

Ugalde *et al.* (2000) demonstraram que a incapacidade das cepas rugosas de se multiplicar no interior da célula não é consequência do fenótipo rugoso, mas sim um fenômeno determinado por um complexo de interações entre a bactéria e a célula hospedeira, envolvendo sistemas sensitivo e regulatório (BvrR/BvrS), secretório (T4SS) e outros fatores ou mecanismos virulentos.

O BvrR/BvrS é essencial para a mudança do ambiente extracelular para o intracelular, contribuindo para seu estabelecimento no fagossomo (Guzman-Verri *et al.*, 2002). O T4SS, codificado por dois componentes do *virB* operon, é um complexo de multiproteínas responsáveis pela secreção de macromoléculas bacterianas e proteínas que atravessam o envelope celular da bactéria para o citossol da célula hospedeira (Arellano-Reynoso, 2005), as quais são necessárias para a fusão com a membrana do retículo endoplasmático e formação de um compartimento de replicação (Billard *et al.*, 2005).

A Fosfatidilcolina e a enzima urease desempenham papéis relevantes na evasão do sistema imune. Diferente de outras bactérias, o fosfolípido da brucela é constituído por fosfatidilcolina. Por estar presente em eucariotos, a fosfatidilcolina não é reconhecida como antígeno pelas células eucariotas (Roop *et al.*, 2009; Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). A urease protege a brucela durante a passagem pelo estômago (Bandara *et al.*, 2007) e a acidificação do fagossoma pela amônia (Seleem *et al.*, 2008).

Outro fator de virulência relevante para este fenômeno é o elemento B-1,2-glucano cíclico (CGS), um polímero de glicose, que contribui para a estabilização da estrutura do envelope (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). A proteína é exigida para interações da brucela em células eucariotas e garante a integridade das cadeias de lipídios na membrana do vacúolo que contém a brucela prevenindo interações extensas desses vacúolos com os lisossomos (Roop *et al.*, 2009). Interagindo com o colesterol, e reorganizando os canais lipídicos de transporte, CGS altera o tráfico intracelular com vantagem para o patógeno (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

A análise do comportamento intracelular da bactéria é indispensável para a compreensão da patogenia da doença e também o fator chave para o delineamento de novas vacinas, elaboração de técnicas diagnósticas e para o sucesso de tratamentos terapêuticos alternativos (Poester *et al.*, 2013).

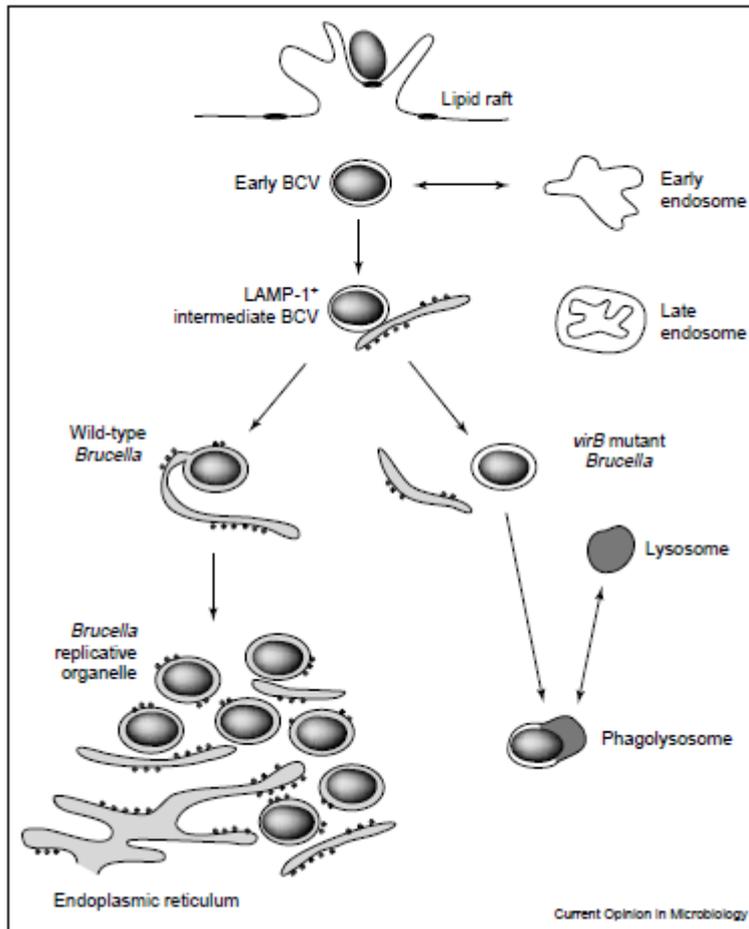
## 2.4 Patogenia

A invasão pelo trato digestivo evoca resposta inflamatória limitada e as partículas infectantes são fagocitadas por células de defesa que se localizam abaixo da submucosa do trato intestinal (Aparício, 2013). Uma vez fagocitada, a brucela é capaz de sobreviver em condições adversas impostas à bactéria (Guzman-Verri *et al.*, 2002). Para se esquivar da neutralização, a brucela, em particular a cepa lisa, dispõe de mecanismos patogênicos que podem superar os mecanismos de defesa do hospedeiro (Conde-Álvarez *et al.*, 2012).

*Brucella suis* é capaz de se multiplicar em macrófagos pela habilidade em sintetizar todos os metabólitos necessários para a sua sobrevivência e pela capacidade de resistir ao dano oxidativo celular e aos compostos nitrogenados, pH ácido e peptídeos antimicrobianos. O compartimento de replicação de *B. suis* é pobre em nutrientes e caracterizados por baixa tensão de oxigênio, onde o nitrato pode ser utilizado para a respiração anaeróbica (Köhler *et al.*, 2002).

O estresse provocado pelo ambiente intracelular (Roop *et al.*, 2009) ativa o sistema sensitivo e regulatório (BvrR/BvrS) da bactéria (Guzman-Verri *et al.*, 2002), o qual, por sua vez, aciona o sistema secretório T4SS e, então, uma série de reações são desencadeadas com o objetivo de controlar a maturação do endossomo (Arellano-Reynoso, 2005). O vacúolo contendo a brucela (VCB) segue o caminho endocítico, alterando o tráfego intracelular (Celli & Gorvel, 2008). Moléculas secretórias do T4SS favorecem a fusão do VCB com o retículo endoplasmático da célula e um nicho protegido do sistema imune é formado (Köhler *et al.*, 2003). David (2012) observou que esse compartimento no qual a brucela se instala possui membrana dupla, o que facilita, posteriormente, o seu egresso para a infecção de células vizinhas. A replicação da cepa rugosa no interior da célula está demonstrada na Figura 1.

O fagossomo contendo a cepa rugosa é, em contraste, induzido à fusão progressiva, resultando em um único vacúolo gigante (Ritting *et al.*, 2003). As cepas rugosas não são hábeis em prevenir fusão de endossomos tardios e lisossomos (Porte *et al.*, 2003).



**Figura 1 - Multiplicação da *Brucella* no interior do macrófago, modelo Vir-B dependente.** In: Jean Celli & Jean-Pierre Gorvel, 2004.

As células-alvos são os macrófagos, trofoblastos, células de tecidos do pulmão fetal e dos órgãos reprodutivos de fêmeas e machos (Adams et al., 2002). Embora os trofoblastos sejam células epiteliais não fagocíticas, adquirem a capacidade de degradar eritrócitos da circulação materna. Por isso são conhecidos como trofoblastos eritrofagocíticos (Roop et al., 2009). A invasão da placenta pela *Brucella* ocorre essencialmente por meio dos trofoblastos eritrofagocíticos, com conseqüente disseminação para as células da membrana coriônica-alantóide.

A brucela possui tropismo por eritritol, um carboidrato, presente em maior quantidade no útero gravídico (Rodríguez et al., 2012). Durante a gestação de mamíferos domésticos, a brucela infecta e se multiplica nos trofoblastos, colonizando o útero (Gorvel & Moreno, 2002). A replicação da brucela ocorre geralmente em trofoblastos metabolicamente ativos, células que apresentam produção variada de proteínas e esteróides durante a gestação (Anderson et al., 1986).

Trofoblastos infectados produzem cortisol, um hormônio esteroideal não produzido em condições normais pela placenta (Poester et al., 2013). Mudança de produção de progesterona para o estrógeno eleva a síntese de cortisol e estimula o endométrio a secretar prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>), indicando mudanças hormonais que ocorrem naturalmente próximo ao parto (Roop et al., 2009). A proliferação das brucelas pode interromper a integridade da placenta e separação do epitélio. A placentite provocada pelo patógeno previne o suprimento de nutrientes para o feto e pode levar ao abortamento ou ao nascimento de infectados persistentes (Wanke, 2004).

Placentas de ruminantes e suínos são do tipo epitélio-corial, caracterizada pela aderência, sem invasão, do alantocóron ao endométrio, que se separam no momento do parto. A diferença da placenta nestas duas espécies está na localização das vilosidades coriônicas. Em suínos a placenta é difusa, a união do o córion do feto com a mucosa uterina é por meio de pregas e vilos em várias partes do útero. Em ruminantes, a placenta é multicotiledonária, caracterizada pela união de vilos coriônicos em pontos isolados, os placentomas. Somente por seu intermédio podem ocorrer trocas entre mãe e feto (Hafez, 1995). A ocorrência de abortamento em bovinos é mais frequente no terço final da gestação, enquanto que, em suínos, pode ocorrer em qualquer período.

A capacidade da brucela de se “esconder” no ambiente intracelular sem provocar danos diretos ou alterar as funções básicas da célula, favorece o parasitismo de longo curso (Meador & Deyoe, 1989) com evolução para o estágio crônico (Spera et al., 2006). A bactéria pode ficar incubada por longos períodos, sem induzir manifestação de sintomas, assemelhando-se a um estado aparente de ausência de doença. Entretanto, a infecção está presente no organismo e os sinais clínicos podem aparecer em determinadas situações patológicas ou fisiológicas, especialmente quando houver comprometimento do sistema imune (Fugier, 2007).

## 2.5 Epidemiologia

A epidemiologia da brucelose está estritamente associada a três elementos: reservatórios, rota de transmissão e população susceptível, os quais influenciam as interações entre o patógeno, hospedeiros e o ambiente (Ning et al., 2013).

Galuzo et al. (1944), Gudoshnik (1959) e Khrustcheva (1969) questionaram se os carrapatos *Alveonatus lahorensis* e *Dermacentor daghestanicus* poderiam atuar como vetores na transmissão da doença. O experimento demonstrou que *D. daghestanicus* ou *A. lahorensis* podem ser infectados por *Brucella* e sugere habilidade do vetor em transmitir o agente patogênico durante a sucção.

Mesmo assim, até o momento a infecção pelo vetor não se comprovou como uma via de transmissão da brucelose (Zheludkov & Tsirelson, 2009).

Os roedores são, possivelmente, infectados acidentalmente, apresentando curso da doença transitório, auto limitante e raramente transmitem a bactéria para outros animais (Meyer, 1976). Dessa forma, acredita-se que roedores não são importantes na manutenção da brucelose e não são considerados reservatórios (Abernethy et al., 2011). Tiller et al. (2010b) isolaram uma espécie de brucela em ratos que conviviam próximos a rebanhos não infectados na Austrália. Ainda não se isolou *B. suis* biovar 5, *B. netomae* em animais domésticos e também não é conhecida a patogenicidade de *B. netomae* em outras espécies (Godfroid, 2002).

A via mais comum de transmissão é via oro-nasal, a partir de alimentos e água contaminados com secreções dos portadores (Aleixo et al., 1999). Pode haver transmissão congênita e lactentes podem se contaminar pelo leite de mães infectadas (Ning et al., 2013). A transmissão venérea é relevante para a manutenção da brucelose suína, ovina e canina, entretanto o sêmen pode veicular a bactéria por meio da inseminação artificial, tanto em suínos, quanto bovinos (Bianchi et al., 2006).

O clima pode influenciar a variação na distribuição da brucelose (Luna-Martínez & Mejía-Terán 2002). Clima úmido e temperado favorece a sobrevivência da bactéria (Matope et al., 2010) que pode resistir cerca de 75 dias em fetos abortados a 25°C, 8 meses a 15°C e apenas 4 horas a 45°C (Oliveira, 2000).

Quanto à infecção pelo patógeno, a susceptibilidade depende essencialmente da idade, sexo e da imunidade dos animais (Aparício, 2013), e aumenta com a maturação sexual (Asmare et al., 2013). A maior incidência da doença pode ocorrer em fêmeas e em animais mais velhos (Bernard et al., 2005).

### 2.5.1 Brucelose em animais domésticos e silvestres

A distribuição geográfica da brucelose sofre alterações de acordo com o surgimento de novos focos (Seleem et al., 2010), afetando tanto espécies terrestres quanto aquáticas (Nymo et al., 2013). Acredita-se que uma contaminação fortuita, via cadeia alimentar, possa ser a origem de infecção em baleias, golfinhos e focas. (Audic et al., 2011).

Observa-se que criações diversificadas em um mesmo estabelecimento rural predis põem a infecções cruzadas (Asmare et al., 2013). Ao compartilhar instalações, animais infectados podem ser veículos de disseminação de uma determinada cepa que pode infectar outras espécies (Roxo et al., 1996; Samartino, 2002).

A brucelose em animais silvestres normalmente não influencia a condição sanitária em determinada região. O status livre ou não da brucelose em um país é baseado na situação epidemiológica em animais de produção (Godfroid & Käsbohrer, 2002).

No Canadá oficialmente declarado livre da doença desde 1985 (Nielsen et al., 1995), renas e alces (*Rangifer tarandus* sp.) mantêm infecção por *Brucella suis* biovar 4 em níveis endêmicos. *Brucella suis* biovar 4 também foi isolada em renas no Alaska, Finlândia, Noruega e Rússia, sugerindo que estes animais selvagens possam exercer papel relevante no contexto zoonótico e epidemiológico da brucelose (Nymo et al., 2013).

Determinadas políticas de erradicação adotadas por alguns países preconizam o sacrifício sanitário dos animais selvagens positivos para brucelose, cuja prática é questionada por ambientalistas. Apesar de relatos de transmissão da brucelose a partir de alces e búfalos para o gado doméstico, entre 2002 a 2012, o contínuo sacrifício de animais selvagens no parque ecológico de Yellowstone pode ter impacto a sobre a conservação de áreas de proteção ambiental (Rhyan et al., 2013).

A infecção por *Brucela ovis* não é considerada zoonose, mas causa perdas econômicas. Caprinos também podem ser infectados por esse agente (Cloeckaert et al., 2004). Já *Brucela melitensis*, a mais patogênica, é considerada exótica em nosso país (Veschi et al., 2012).

No Brasil, a brucelose bovina é a mais prevalente. De acordo com relatos oficiais, a prevalência média da brucelose bovina foi estimada entre 4 e 5% no período de 1989 a 1998, (Leite et al., 2003) e no período de 2001 a 2004 foi reduzida para 3,4 %, com intervalo de amplitude considerável, sendo a prevalência mínima encontrada em SC de 0,66% e máxima em MT de 10,2% (Brasil, 2016a).

A identificação dos fatores de risco que influenciam a epidemiologia é essencial para a adoção de um controle estratégico da doença. O trânsito de animais entre as propriedades é um dos fatores predisponentes para a introdução da doença no rebanho (Matos et al., 2004).

Os fatores de risco podem estar associados à proximidade de rebanhos infectados, criações de espécies susceptíveis que por ventura estabeleçam contato (Omer et al., 2000), compartilhamento de cochos, nível de vacinação, condições de instalações, densidade populacional (Omer et al., 2002). Alojamentos que não recebem luz solar podem facilitar a disseminação da brucela por meio de alimentos e água contaminados e a manutenção da infecção (Amaral et al., 2015). Ausência de separação de locais específicos para maternidade aumenta a disseminação do patógeno no ambiente (Omer et al., 2000) e até animais que se alimentam de carcaças de outros animais mortos em decomposição podem contribuir para a disseminação da doença (Ning et al., 2013).

### 2.5.2 Brucelose em suínos

A doença em suínos caracteriza-se por redução do tamanho da leitegada, nascimento de leitões fracos, abortamentos, aumento do intervalo entreaios e infertilidade em machos (Olsen et al., 2014). Sinais clínicos, como metrite, orquite, abscessos, laminite, espondilite e paralisia de membros posteriores (Pilo et al., 2015) já foram relatados em suínos. Entretanto, na maioria dos casos, a doença é clinicamente silenciosa, especialmente em animais que ainda não atingiram a maturidade sexual (Goodwin & Pascual, 2016).

Os principais fatores de riscos associados à brucelose suína são a introdução de animais infectados, contato com reservatórios silvestres, inseminação artificial com sêmen de varrões infectados (Pearson et al., 2016) e contato com suídeos asselvajados (Aparício, 2013). O fornecimento de soro de leite de vaca sem tratamento térmico adequado para a alimentação de suínos torna-se relevante no contexto epidemiológico, uma vez que os suínos podem atuar como reservatórios de *B. abortus* por longos períodos (Stoffregen et al., 2007). Leite et al. (2014) A presença de bovinos infectados em uma mesma propriedade pode favorecer a contaminação cruzada e a disseminação da brucelose em suínos (Leite et al., 2014).

Suídeos silvestres infectados por *Brucella suis* biovar 2 representam risco para explorações de suínos na Europa (Kreizinger et al., 2014) e nos Estados Unidos (Leiser et al., 2013). A caça destes animais também deve ser considerada no contexto epidemiológico. Na Geórgia, EUA, onde a caça de javalis considera-se um esporte, isolou-se *B. suis* em cães que haviam participado desta atividade (Hanam et al., 2011).

O primeiro relato de *B. suis* biovar 1 nos Estados Unidos foi em 1976 por Wood et al. e desde então, a população suídeos selvagens é monitorada. Entretanto, a movimentação detectada no sul do Texas indica potencial risco de disseminação para população doméstica (Wykoff et al., 2005).

Pilo et al. (2015) sugerem incluir a vigilância soroepidemiológica em criações de suínos no programa de erradicação da brucelose na Itália, uma vez que focos posteriores a declaração de livre da brucelose, em 1998, surgiram com origem em suídeos selvagens.

Mota et al. (2010) acreditam que a prevalência de brucelose no Brasil seja baixa, corroborando com resultados do inquérito realizado em nível nacional, que estimou em 0,34% a prevalência média de infecção por brucela para o rebanho suíno (Brasil, 2000).

Poester et al. (2002) relatam que a intensificação da suinocultura é um dos fatores que contribuiu para a redução da brucelose suína, uma vez que maiores índices de prevalência são provenientes de abate clandestino. Freitas et al. (2001) encontraram percentual de 42,2% da brucelose suína em abate clandestino no Pará. Entretanto, Poester et al. (2002) ressaltam que estudos conduzidos em frigoríficos inspecionados e em granjas comerciais, evidenciam que a brucelose suína ainda circula no Brasil e que esforços são necessários para o controle e erradicação da doença.

Publicações regionais reforçam os dados de Poester et al. (2002) e indicam que a brucelose suína está presente no nosso território. Em pesquisas soroepidemiológicas conduzidas no Nordeste, Ribeiro et al. (2001) relataram 31,8% de prevalência da brucelose em granjas comerciais no estado de Pernambuco. No Rio Grande do Norte, Leite et al. (2014) relataram 17,5% de rebanhos positivos em Mossoró. Em contrapartida, no Piauí, Braga et al. (2013) encontrou apenas 1,04% de positivos em suínos de criação intensiva e Aguiar et al. (2006) identificaram 0,9% de positividade em criatórios de suínos em Rondônia.

Estudos conduzidos na região centro-oeste e sudeste também sugerem a circulação da doença. Por meio de estudos sorológicos realizados em frigoríficos em Goiás, Matos et al. (2004) estimaram 2,5%; e Barthasson (2005), 1,7% de prevalência suína. Em São Paulo, Rosa et al. (2012) identificaram que 2,7% de suínos abatidos em frigoríficos eram positivos para anticorpos anti-brucela. No Rio de Janeiro, Jesus et al. (2010) encontrou positividade relativamente menor em matrizes e reprodutores (8,9%) quando comparada ao plantel como um todo (12,8%).

### 2.5.3 Brucelose em humanos

Em detrimento aos notáveis avanços da ciência, a brucelose humana é a doença bacteriana crônica mais comum no mundo (Vallat, 2013). Atualmente, mais de meio milhão de casos humanos são reportados (Plumb et al., 2013). Em regiões endêmicas a quantidade de pessoas atingidas pela doença pode superar 10 casos a cada 100.000 habitantes (Pappas et al., 2005). Entretanto, estatísticas oficiais não refletem exatamente o verdadeiro número de pessoas afetadas (Al Dahouk & Nockler, 2011) e acredita-se que a brucelose seja subnotificada (Bonfoh et al., 2012).

A sua distribuição geográfica coincide com a endemia animal, atingindo em especial, a faixa etária dos 55-64 anos, com predomínio masculino (Pessegueiro et al., 2003). Mas, apesar da maioria das infecções por brucela ocorrerem em regiões endêmicas, é possível o diagnóstico da brucelose em humanos em países livres da doença proporcionada pelo trânsito internacional de animais, produtos e pessoas (Al Dahouk et al., 2005a).

A ausência de sintomas específicos torna mais difícil distinguir brucelose de inúmeras doenças com cursos febris como a malária (Diaz *et al.*, 2011), febre tifóide e tuberculose (Kunda et al., 2007). O diagnóstico é realizado por critérios clínicos e laboratoriais (La Rosa et al., 2012). O laudo correto e em tempo hábil continua sendo um desafio para patologistas (Franco et al., 2007).

Apesar da baixa mortalidade, a brucelose é uma doença debilitante (Falenski et al., 2011) e pode deixar sequelas (Plumb et al., 2013). A brucela pode se instalar em qualquer parte do organismo humano (Cutler et al., 2005). Os sinais clínicos da brucelose em humanos são febre recorrente, artrite, mialgia, dor abdominal, dor de cabeça, encefalite, artrite, endocardite (Zhong et al., 2013).

A forma mais comum de transmissão é por consumo de leite e derivados lácteos não pasteurizados (García-Juárez et al., 2014). Sob condições normais de crescimento, a brucela sobrevive 87 dias no leite, 60 dias na água e pouco menos que 7 dias em iogurte (Falenski et al., 2011).

A transmissão também pode ocorrer por contato com animais infectados ou com materiais contaminados (Garro et al., 2005). Na Colômbia a brucelose é considerada uma doença ocupacional (Ortegón et al., 2003). Frigoríficos, especialmente aqueles que abatem

suínos, representam risco aos magarefes (Escobar et al., 2013) pelo alto risco de contaminação por aerossóis (Rodríguez et al., 2009). Na África, a doença apresenta maiores taxas de infecção entre pequenos produtores e comunidades pastorais (Plumb et al., 2013). Na China, o diagnóstico da brucelose em humanos se intensificou entre 2005 a 2010 (Zhong et al., 2013).

Casos humanos de infecção por *B. suis* apresentaram vínculo epidemiológico com o consumo de carne de suídeos selvagens (Sandfoss et al., 2012; Kutlu et al., 2016; Quance et al., 2016). Apesar de alguns autores questionarem a transmissão da brucelose pelo consumo de carne (Arellano-Reynoso et al., 2005), no Brasil é permitido o consumo de carne in natura de abate sanitário de carcaças sem lesões (Brasil, 2016a).

A infecção em humanos é geralmente originada de reservatório animal (Godfroid, 2013), mas em função da contaminação por aerossóis e fácil disseminação (Pappas et al., 2010), a bactéria pode ter finalidades militares, razão de haver sido incluída na lista de potenciais agentes de emprego possível em armas biológicas (Bagues et al., 2004; Zhong et al., 2013).

## **2.6 Testes diagnósticos**

O diagnóstico da brucelose pode ser realizado por métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos, sejam por exames bacteriológicos ou moleculares, possuem a finalidade de identificar o agente patogênico por meio da cultura da bactéria, diferenciação por testes bioquímicos ou adoção de protocolos moleculares. Diagnóstico por métodos indiretos possuem a finalidade de identificar anticorpos anti-Brucela, sugerindo o contato do animal com o agente patogênico.

### **2.6.1 Bacteriológicos**

O diagnóstico inequívoco da infecção é realizado pelo isolamento da brucela (Pappas et al., 2005), cuja caracterização é fundamental para estudos de vigilância (OIE, 2009). A identificação fenotípica e genotípica é essencial para subseqüentes investigações epidemiológicas e para a implantação de medidas de controle e erradicação efetivas (Abril et al., 2011).

Entretanto, segundo Fernandez-Prada et al. (2001), por ser um micro-organismo fastidioso, a cultura a partir de amostras biológicas é um desafio e laboratórios com biossegurança nível III são requeridos (Ergonul et al., 2004). A distinção entre espécies e biotipos baseia-se no requerimento de CO<sub>2</sub>, produção de H<sub>2</sub>S, atividade da urease, aglutinação a partir de epítomos específicos (A e M) e inibição seletiva no meio com tionina e fucsina. O percentual de crescimento microbiológico em ágar sangue varia de 15 a 75% e o período para a liberação de resultados é longo, podendo levar dias ou mesmo semanas (Al Dahouk et al., 2007).

Portanto, apesar do exame bacteriológico ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico da brucelose (Bricker, 2002), os inconvenientes desta técnica favorecem a adoção de métodos diagnósticos moleculares e sorológicos.

### **2.6.2 Moleculares**

Estudos na área molecular são crescentes e o aprimoramento de diagnóstico permite a avaliação taxonômica de isolados distintos (Foster et al., 2002). O diagnóstico por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é mais rápido, sensível, e não necessita de crescimento em meio de cultura, uma vez que são identificados fragmentos de DNA, ou genes específicos como os genes omp (genes das proteínas de membrana externa): omp2a, omp2b, omp25, omp31 (CloECKaert et al., 2002a), e omp16 (Kaur et al.; 2015), além de outros.

Já foram validados protocolos com amostras de sangue, sêmen, secreção nasal, tecidos fetais e maternos. Também é possível e bastante útil o diagnóstico de PCR a partir de leite e queijo (Bricker, 2002).

PCR em tempo real e amplificação de genes recombinantes permitem melhor compreensão dos mecanismos patogênicos. Um modelo obtido por Kaur et al. (2015) para amplificar o gene Omp16 e cultivado em células de camundongos, expressou alto efeito imunogênico. Resultados desta pesquisa e outras similares são úteis para pesquisas de vacinas e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

A análise PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - restrita a análise do polimorfismo em fragmentos) permite a identificação do biovar, boa reprodutibilidade, estabilidade e concordância epidemiológica. PCR-RFLP tem sido usado para distinguir a maioria das espécies de Brucela e seus biovars (Al Dahouk, 2005b).

Ensaio multivariados da PCR (reação em cadeia da polimerase) possuem a finalidade de possibilitar diferenciar todas as 10 espécies classificadas até o momento. Considerado um método diagnóstico rápido e robusto por Kang et al. (2011) e com resultados satisfatórios. A técnica pode ser aplicada como ferramenta diagnóstica em humanos e também como aprimoramento de estudos epidemiológicos, contribuindo para erradicar a brucelose em países em desenvolvimento com recursos limitados.

Em função da taxonomia da brucela ser respaldada na patogenicidade, especificidade ao hospedeiro e epidemiologia geográfica e não apenas na caracterização molecular, tal histórico pode interferir na interpretação dos resultados obtidos (Moreno et al., 2002) principalmente quando se deseja identificar *B. suis*, cujos marcadores biológicos específicos de ainda não foram completamente esclarecidos (Whatmore, 2009).

Um novo método de diagnóstico a partir de amostras biológicas é o MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, um espectrofotômetro de massa para classificação e identificação de microorganismos, baseado na identificação do proteoma, o qual apresenta uso promissor para a identificação da brucela, ao permitir que mesmo diferenças genéticas menores sejam encontradas em proteínas específicas (Meisel et al., 2012). A principal vantagem desse novo método é a precisão e boa relação custo-benefício (Ferreira et al., 2010). É rápido, eficaz e adequado para a caracterização correta, especialmente para os casos de inconsistências taxonômicas e genes relacionados à espécie e biovar filogeneticamente próximos (Lista et al., 2011). Entretanto por falta de parâmetros de referências padronizados, esta técnica foi testada por poucos autores (Ferreira et al., 2010).

Diagnósticos moleculares baseados em métodos de polimerização como Ensaio multivariados da PCR (Kang et al., 2011) são mais comumente aplicados em medicina veterinária e nos laboratórios brasileiros.

### **2.6.3 Sorológicos**

A execução de técnicas sorológicas para brucelose iniciou há mais de 100 anos como testes de soroaglutinação simples. Os métodos diagnósticos rotineiros detectam anticorpos contra os componentes da membrana externa, sendo o lipossacarídeo (LPS-O) o mais abundante (Ganesh et al., 2014).

Apesar de apresentar vantagens por serem rápidos, baratos e de simples execução, resultados falsos positivos podem ocorrer em função de reações cruzadas inespecíficas, principalmente por aglutinação de anticorpo "anti-LPS-O" de outras bactérias gram-negativas com o antígeno utilizado (Castro et al., 2006). O desafio dos testes de triagem é apresentar alta sensibilidade, mas menor número de falsos positivos possíveis (Nielsen et al., 2002).

Reações cruzadas atribuídas a infecções por *Yersinia enterocolitica* O:3 e *Yersinia enterocolitica* O:9 são frequentes em amostras de soro de sangue de bovinos (Kittelberger et al., 1995) e de suínos (Nielsen et al., 2006), constituindo a fonte de falsos positivos mais importante (McGiven et al., 2015). *Escherichia hermanni*, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 e *Escherichia coli* O:157 são um problema particularmente relevante por também expressarem "antígenos-O" homólogos (Corbel, 1997; Allen et al., 1998). Outras bactérias representadas por *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O:116, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Vibrio cholera* também são conhecidas por causar reações cruzadas (Nymo et al., 2013).

As reações inespecíficas caracterizam-se pela aglutinação de IgM presente no soro com o antígeno selecionado. A resposta humoral inicial é marcada pela produção inicial de IgM, a qual é dependente da dose infectante, do estado de saúde do animal e da rota de transmissão. A produção de IgM é seguida de IgG<sub>1</sub> e mais tarde acompanhada de breve produção de IgG<sub>2</sub> e IgA (Nielsen, 2002). A magnitude da resposta IgG<sub>1</sub> ao LPS-O de *B. abortus* é praticamente idêntica àquela induzida pelo "LPS-O" da *Y. enterocolitica* O:9 (Nielsen, 1990).

Mesmo com a alta sensibilidade apresentada pelos testes sorológicos de triagem, ainda é possível ocorrer resultados negativos em testes sorológicos referentes a animais infectados, mas sem evidência clínica e sem apresentarem imunoglobulinas detectáveis, mas em detrimento dessa condição, esses animais ainda podem disseminar a doença (Van Aert et al., 1985).

O teste de hipersensibilidade intradérmico apresenta-se como método diagnóstico alternativo para a redução das reações falso-positivas com alta especificidade em suínos (Dieste-Pérez et al., 2015a). Entretanto, provavelmente pela exigência de duas visitas do veterinário para a aplicação e leitura, o seu uso ainda é restrito em granjas.

Os métodos sorológicos reconhecidos são o teste antígeno acidificado tamponado – AAT; os ensaios imunoenzimáticos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) entre eles:

ELISA indireto (iELISA) e ELISA competitivo (cELISA); Polarização Fluorescente (PF); Fixação de Complemento (FC); Soro Aglutinação Lenta (SAL) e 2-Mercapto-Etanol (2-ME) (Escobar et al.; 2013). Para incrementar o valor preditivo recomenda-se a adoção de dois testes: um mais sensível e outro com maior especificidade. Normalmente o mais específico é mais caro e mais elaborado, mas necessário para confirmar os resultados positivos apontados pelo teste de triagem (Nielsen, 2002).

Apesar de nenhum teste sorológico demonstrar ser confiável no diagnóstico da brucelose suína (Paulo et al., 2000; Seleem et al., 2010), o AAT, também conhecido como teste Rosa Bengala, é a técnica oficial (BRASIL, 2006) e o mais indicado na rotina da suinocultura (Muñoz et al., 2012), também usado para controle da brucelose em bovinos (Megid et al., 2000; Monteiro et al., 2006) e para o diagnóstico em humanos (Kaur et al., 2015).

O AAT apresenta maior sensibilidade quando comparado aos outros testes (Dieste-Pérez et al., 2015b) e qualquer reação de aglutinação é considerada positiva. O método se baseia na maior atividade de IgG<sub>1</sub> em pH ácido, reduzindo a atividade de IgM (McGiven et al., 2012). Apesar de ser um teste qualitativo (Muñoz et al., 2012), Muma et al (2009) classificou a intensidade da aglutinação em uma escala de 0 (não reagente) a 3 (com formação de grumos evidentes).

Diferenças nos critérios metodológicos e antígenos utilizados podem influenciar a sensibilidade do teste AAT, a qual dependerá do antígeno utilizado, como se evidenciou em recentes experimentos conduzidos na Europa para a padronização de diagnóstico da brucelose em suínos reagentes (Tayler et al., 2016).

Apesar de não ser uma técnica preconizada pelo programa nacional, o uso das técnicas imunoenzimáticas ELISA é crescente e são testadas com diferentes variações. ELISA indireto é adequado para animais selvagens da região do Ártico, sendo usado em renas, alces, ursos polares e mamíferos aquáticos (Nymo et al., 2013). ELISA competitivo é sugerido como teste confirmatório, descrito com especificidade de 99,7% (Nielsen et al., 1995) e capaz de diferenciar a infecção em campo por brucela e yersinia (Nielsen, 1990; Nielsen et al., 1995). Novos ensaios incluem proteínas recombinantes, extratos de proteínas citoplasmáticas e cepas mutantes sem o LPS-O (McGiven et al., 2015).

Testes diagnósticos de conjugados de extratos de oligossacarídeos são capazes de distinguir a infecção natural de anticorpos vacinais (Blasco & Molina-Flores, 2011) e podem

ser a solução em técnicas imunoenzimáticas para diferenciar animais vacinados dos infectados e uma opção no futuro para vacinas (McGiven et al., 2015). Além desses, outros imunoenaios baseados em proteínas poderiam solucionar o problema de falso-positivos, uma vez que as proteínas da bactéria brucela não fazem reação cruzada com aquelas que estão potencialmente envolvidas em reações falso-positivas (Jungersen et al., 2006).

Em rebanhos suínos, a técnica Polarização Fluorescente, validada oficialmente, não apresentou resultados satisfatórios (Paulo et al., 2000), e não foi capaz de diferenciar as reações cruzadas (Weiner et al., 2012), mas apresentou boa concordância com o AAT quando aplicado em bovinos (Muma et al., 2009).

O teste 2-Mercapto Etanol (2-ME) e o teste de fixação de complemento (FC) são confirmatórios, sendo o teste FC eleito para o trânsito internacional. Ambos os testes são úteis para o diagnóstico de brucelose crônica, período que a infecção permanece ativa mesmo quando os títulos de anticorpos retornam aos níveis baixos. Infere-se, portanto que a reação presente no 2-ME indica fase crônica da doença (Seleem et al., 2010).

A técnica soroaglutinação lenta - SAL permite identificar infecções recentes, mesmo assim não é eficaz durante o período de incubação ou fase sub-aguda da doença (Kunda et al., 2007). Animais infectados em estágios iniciais, sob processo de soroconversão, podem não possuir anticorpos suficientes para ser detectados pelos testes sorológicos (Praud et al., 2012). Também não é indicada em período peri-parto ou seguido de abortamento (Kunda et al., 2007).

Os testes que promovem a aglutinação de IgM, como o teste SAL, são preteridos em relação àqueles capazes de neutralizar reações inespecíficas, mas desde que associados a uma técnica que posteriormente elimine esse artefato, podem ser utilizados. Assim é desejável realizar a execução dos testes SAL e 2-ME em paralelo.

A metodologia do teste 2-ME é empregada da mesma forma que a técnica SAL, com a diferença da adição do elemento químico 2-ME, responsável por quebrar as ligações das pontes de dissulfeto, fazendo com que IgM sejam inativadas, e permitindo que apenas as aglutinações com IgG resistam a quebras desencadeada pelo 2-ME.

Preconiza-se, portanto, que estes dois testes sejam realizados em associação em função do teste soro aglutinação lenta- SAL ser bastante sensível ao promover a aglutinação IgM, e ao

adicionar o reagente redutor (2-ME) permitir a neutralização de IgM (Nielsen, 2002). Dessa forma, a leitura deste método sorológico confirmatório é realizada a partir da comparação das diluições dos tubos dos testes SAL e 2-ME, o valor preditivo do teste é potencializado e consequentemente o resultado é mais confiável.

O teste eleito deve ser adaptado para o contexto epidemiológico. Praud et al. (2012) relata que em países europeus, como a França, onde a brucelose é esporádica, sinais clínicos são fáceis de serem detectados e testes mais específicos devem ser priorizados no intuito de evitar falsos positivos em rebanhos livres. O autor recomenda ELISAc para diagnóstico da brucelose em suínos, por representar a técnica sorológica com maior sensibilidade e especificidade, ressaltando que qualquer outro teste não poderia ser adotado sozinho, necessitando de associação entre testes para alcançar resultados mais precisos.

## **2.7 Controle e Prevenção**

O controle da doença em humanos é feito nas espécies domésticas, nos reservatórios silvestres e pela adoção de boas práticas de fabricação de produtos de origem animal (González et al., 2008). A vacinação em rebanhos e a pasteurização do leite, inclusive para a fabricação de produtos lácteos, contribuem para controle da saúde pública em áreas endêmicas, associado ao abate sanitário de animais positivos para o alcance da erradicação. O controle da brucelose deve ser visto como um problema multifatorial e crucial para a integração de veterinários, profissionais da saúde e ambientalistas, cujos desafios devem ser enfrentados e as oportunidades priorizadas (Plumb et al., 2013).

O impacto econômico da doença é maior, sobretudo em países em desenvolvimento. Estima-se que perdas relacionadas à brucelose na América Latina alcançam US\$ 600 milhões por ano (Seleem et al., 2010). Apenas no México, o custo anual com prejuízos diretos e indiretos representam US\$ 200 milhões por ano (Luna-Martínez & Mejía-Terán, 2002). Custos de intervenção na Mongólia para erradicação da brucelose aproximam-se a 8,3 milhões de dólares, em contrapartida, calcula-se 26,6 milhões de dólares em benefícios alcançados com o status livre da doença (Zinsstag et al., 2007).

Na China, o programa de erradicação nacional da brucelose foi implementado na década de 90 (Zhong et al., 2013). Após 30 anos de investimentos com a vacina S2 a prevalência da brucelose no rebanho doméstico na China caiu de 25% para 0,1% (Zhu et al.,

2016). Além da imunização, testes diagnósticos rápidos e seguros são desejados por constituírem ferramenta necessária para a adoção de medidas eficazes em animais e coibir a transmissão para humanos (Kang et al., 2011).

Embora programas de erradicação sejam caros, para cada dólar gasto há uma expectativa de 7 dólares de retorno em benefícios (Seleem et al., 2010). Argentina reduziu o custo de produção em US\$1,20 por bovino quando houve redução de 5% da prevalência da brucelose (Samartino, 2002). Em contrapartida, na Nigéria, os custos por bovino aumentaram US\$ 3,16 quando a prevalência subiu de 7% para 12% (Ducrotoy et al., 2014). Segundo Zinsstag et al. (2007), o controle da brucelose se tornou uma das intervenções com melhor custo benefício das zoonoses, com economia acima de 25 dólares por dia no setor de saúde pública.

Modelos propostos por alguns autores implicam em aprimoramento epidemiológico para notificação de abortamentos e tomada de intervenções (McDermott, 2013), uma vez que sua ocorrência pode estar relacionada à presença da doença no rebanho (Schelling et al., 2003). Em Portugal, na cidade de Azores, a notificação de abortamentos é obrigatória, permitindo quantificar o número de ocorrências e a investigação do problema (Blasco & Moriyon, 2010). Também a Espanha reduziu drasticamente a prevalência da brucelose em bovinos quando produtores passaram notificar abortamentos e o trânsito de áreas infectadas foi proibido (Sanz et al., 2010).

Já no continente africano, o controle da brucelose ainda é incipiente, sendo baseado em estudos de inquéritos epidemiológicos e identificação de fatores de riscos que influenciam a prevalência da doença especialmente no rebanho bovino (Schelling et al., 2003; Muma et al., 2007). Na Etiópia, Asmare et al. estimaram a prevalência média do rebanho leiteiro em 1,9%. Já em Uganda, Bernard et al. (2005) estimaram prevalência média da brucelose bovina em 15,8%, e Matope et al. (2010) encontraram índices ainda mais elevados: 25% de prevalência média da brucelose bovina.

A brucelose em suínos também causa grandes prejuízos, mas há poucas informações direcionadas a esta espécie em países em desenvolvimento (Luna-Martínez & Mejía-Terán, 2002). Para o estabelecimento de programas de controles, primeiramente, recomenda-se conhecer a situação epidemiológica dos diferentes rebanhos nas diversas localidades para então elaborar um programa de controle nacional (McDermott, 2013).

Para que o programa de controle seja eficiente, torna-se necessário o diagnóstico das condições sanitárias, sociais e econômicas, com adoção de medidas adaptadas à situação real de cada unidade federativa e participação compartilhada dos setores envolvidos, incluindo, membros da comunidade, líderes políticos locais, profissionais de saúde e veterinários autônomos.

Atividades de educação sanitária, vacinação eficiente e segura, adoção de programas estratégicos de controle e erradicação validados por organismos internacionais são medidas que precisam ser avaliadas no contexto de cada país, levando em consideração as diferenças entre as espécies e regiões.

### **2.7.1 Educação Sanitária**

A educação sanitária é imprescindível para o controle da brucelose (Lindahl et al., 2015), pois o conhecimento adquirido pela população local, produtores e trabalhadores contribuem para prevenir ou reduzir a contaminação (Kunda et al., 2007). La Rosa et al., (2012) defendem que uma boa alternativa seria estender as intervenções educativas para instituições escolares permitindo a formação de multiplicadores .

Kansiime et al. (2015) demonstram que integrar educação sanitária de acordo com a necessidade da comunidade, como uma atividade direcionada, é eficaz. Em sua pesquisa, os entrevistados acreditam que veterinários e equipes de saúde poderiam treinar facilitadores para disseminar a conhecimento sobre brucelose. Para viabilização desta prática, convênios entre governos estaduais e instituições de ensino com fins de alertar a população sobre os riscos das doenças transmitidas por alimentos (La Rosa et al., 2012) e zoonoses (Ward et al., 1993) devem se concretizar.

Zinsstag et al. (2005) acreditam que o fortalecimento do sistema por meio de novas ferramentas para alcançar a população contribui para intervenções relacionadas à saúde pública em médio e longo prazo. As autoridades oficiais sanitárias em países que não dispõe de muitos recursos estimulam encontros com veterinários de campos e produtores com o intuito de aumentar a vigilância passiva (Blasco & Moriyon, 2010). O envolvimento de participantes da comunidade agrega vantagens para o programa de controle. O processo

envolvendo o reconhecimento do valor do conhecimento do povo local pode ajudar a fortalecer o relacionamento entre a sociedade e o serviço veterinário oficial.

Em regiões da África, onde as prevalências são altas, o conhecimento sobre a brucelose e a vacinação em animais é limitado. Entretanto, Catley (2006) observou que a percepção de pastores, no leste do continente africano, incrementa o sistema de vigilância a partir da comunicação da suspeita de doenças de notificação obrigatória. O autor ressalta que o fluxo de informações deve ser encorajado, especialmente em comunidades carentes, cujo acesso é remoto e recursos, limitados.

A cultura e estilo de vida em sistemas de agricultura de subsistência criam condições favoráveis para a disseminação e transmissão da brucelose. Os riscos associados a práticas de manejo dificultam o controle da doença, algumas vezes por falta de soluções simples (Kunda et al., 2007). Um estudo na Grécia demonstrou que a educação sanitária combinada com a vacinação reduziu a incidência da brucelose humana (Jelastopulu et al., 2008). Outro estudo conduzido na Ásia Central evidenciou que a não utilização de equipamentos de proteção individual ao manejar vacas durante o parto e o consumo de leite cru eram mais comuns entre produtores com baixo nível de instrução (Lindahl et al., 2015).

Pouco conhecimento, comportamento de alto risco e o desejo de aprender mais sobre a doença justificam a educação no campo, em escolas e em associações (Lindahl et al., 2015). Tais atividades incluem esclarecimentos sobre cuidados na aplicação da vacina, identificação de sinais clínicos em animais e humanos, acesso ao serviço de saúde, medidas de prevenção e até mesmo instruções e técnicas relacionadas a boas práticas de fabricação (Kansiime et al., 2015).

Nesse contexto, a educação sanitária incentivada por entidades governamentais, associações e a iniciativa privada é uma estratégia simples, de baixo custo e com ótimos resultados (Smits, 2013), demonstrando que a compreensão da doença é tão essencial quanto a vacinação dos animais susceptíveis (Kansiime et al., 2015).

### **2.7.2 Vacinas no contexto da Brucelose**

Ainda não há vacinas para humanos, principalmente pelo fato das comercialmente adotadas serem vivas e conseqüentemente não suficientemente seguras. As vacinas mais

utilizadas em rebanhos são a SB19, RB51 e REV1 (Chacón-Díaz et al., 2011). As duas primeiras são preparadas com cepas vivas *B. abortus* para o controle da brucelose bovina. A SB19 ou simplesmente B19 consiste no extrato da cepa lisa para aplicação em fêmeas de 3 a 8 meses de idade e a RB51, uma variante rugosa, possui o uso permitido em vacas adultas (Blasco & Moriyon, 2010). A REV1, constituída pela cepa lisa *B. melitensis* é a vacina mais usada em pequenos ruminantes e é administrada, por conveniência, em todo rebanho (Blasco, 1997).

Poucos países adotam política específica para suínos, mas a China e Líbia utilizam a vacina S2, elaborada a partir do extrato atenuado de *B. suis*, para o controle da brucelose em bovinos, pequenos ruminantes e suínos (Czibener et al., 2016). A S2 foi desenvolvida a partir de uma cepa isolada em 1952 de um feto suíno e é adotada na China desde 1971 (Zhu et al., 2016). No Brasil, o programa de vacinação é direcionado a bezerras, não se vacina outras espécies contra brucelose, e não há vacina específica contra infecção de *Brucella suis*.

Para conferir maior proteção, campanhas de vacinação devem priorizar vacinas com cepas lisas ou associação de ambas (Miranda et al., 2016). Blasco & Molina-Flores (2011) acredita que as vacinas com cepas lisas são mais adequadas para pequenos ruminantes, apesar de haver ocorrências de abortamentos. Sanz et al. (2010) acreditam que programas que incluam a vacinação RB51 em animais adultos, mantendo a imunização com a vacina B19 e frequência de testes sorológicos quatro vezes ao ano são eficazes para a erradicação da brucelose em bovinos. A RB51, como vacina única, foi adotada apenas em Azores, Portugal (Martins et al., 2009), não sendo a vacina preconizada de forma exclusiva para erradicação da brucelose (Sanz et al., 2010).

A prevalência de *Brucella suis* biovar 2 em suídeos selvagens incentivou a pesquisa nos Estados Unidos para o desenvolvimento de uma vacina recombinante rugosa a partir da cepa RB51 e que demonstrou ser eficaz contra infecção de *Brucella suis* (Rajasekaran et al., 2011). Lord et al. (1997) relata que reações de aglutinação em suínos não vacinados ou imunizados a partir de cepas rugosas confirmaria infecções ativas mesmo em técnicas sorológicas simples, mas reforça que estudos para vacina de cepa rugosa para suínos ainda devem ser incentivados.

Banai et al. (2002) testaram uma cepa rugosa como protótipo para caprinos, após uma observação na qual a cepa REV1 foi transferida horizontalmente para um caprino não

imunizado e a cepa de origem vacinal se transformou espontaneamente em rugosa. Entretanto, protótipos de variantes rugosas para o uso em pequenos ruminantes ainda não apresentaram bons resultados, sendo REV1 a única vacina eficaz contra *B. melitensis* (Blasco & Molina-Flores, 2011). Acredita-se que o uso contínuo da REV1 comercial, mesmo provocando efeitos colaterais, justifica-se pelo fato das vacinas rugosas experimentais não estimularem uma proteção duradoura (Cloeckaert, 2004).

Proteções induzidas por cepas rugosas geram reação inflamatória mais branda, uma vez que a variante é mais facilmente neutralizada por anticorpos específicos quando comparadas a cepas mais virulentas oriundas de infecção natural (Baldwin & Parent, 2002). Já a vacina com a cepa lisa mimetiza a infecção natural (Banai et al., 2002) por estimular lenta e continuamente o sistema imune, enquanto há replicação no hospedeiro (Blasco & Molina-Flores, 2011). Portanto a imunização a partir de extratos com cepas lisas possui a finalidade de induzir não apenas a resposta humoral, mas também a celular.

O efeito protetor das vacinas ainda pode ser aumentado quando se administra pela via mucosa. Enquanto que a aplicação pela via subcutânea induz persistência de anticorpos por 2 a 3 meses (Blasco, 2006), a persistência de anticorpos pela via conjuntival é mais duradoura, talvez pelo fato da infecção ocorrer predominantemente pelo tecido mucoso (Goodwin & Pascual, 2016).

A via conjuntival com uma cepa *B. melitensis* mutante sem o LPS-O foi testada com resultados satisfatórios por Blasco (1997) em ovelhas. Em suínos, a aplicação da S2 é utilizada via oral e já existem protótipos rugosos de *B. suis*. Entretanto, segundo Czibener et al. (2016), a administração via água de consumo gera preocupação, pois ainda que a vacina seja atenuada, a bactéria é viva e virulenta.

A vacina ideal deve induzir proteção duradoura, não ser patogênica para o hospedeiro, ser geneticamente definida, não apresentar resistência a antibióticos, ser estável sob condições experimentais e não deve interferir em diagnóstico sorológico (Ugalde et al., 2003).

Em suínos, ainda não existem vacinas contra a infecção da brucelose que confirmam biossegurança adequada e que também sejam eficientes (Czibener et al., 2016) e um dos maiores objetivos em pesquisas de controle da brucelose é o desenvolvimento de novas vacinas que sejam seguras e apresentem as características ideais (Cloeckaert et al., 2004).

As condições metabólicas da brucela desempenham um importante papel na atenuação das propriedades da vacina (Zhu et al., 2016). Estudos a partir de delineamentos com alteração na expressão gênica, reduziria a virulência da vacina (Banai et al., 2002) e poderia direcionar a estudos que atendessem os requisitos desejados para proteção adequada em suínos.

Vacinas com marcadores se apresentam como uma nova opção para diferenciar animais imunizados dos infectados. Um protótipo da vacina *Brucella abortus* B19 com expressão de proteínas verdes fluorescentes (B19-PVF) foi testado por Chacón-Díaz et al. (2011). Ensaio imunoenzimático delineado para medir anticorpos anti-B19-PVF permitiram a discriminação de animais vacinados (B19-PVF) daqueles oriundos de infecção natural. Este tipo de vacina se apresenta como melhor estratégia quando se adota abate sanitário de animais reagentes para alcançar a erradicação que propriamente a adoção de vacinas rugosas.

Embora, vacinas inativas não sejam propriamente consideradas, a vacinação a partir de subunidades do DNA ou plasmídeos pode despertar o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas anti-brucelose (Kurar and Splitter, 1997 citado por Blasco, 2006). Martins et al. (2012) administrou nano partículas de *B. ovis* na pálpebra de camundongos e concluiu que a vacina com nano partículas é uma alternativa para substituir REV1 em ovinos.

Estudos a partir de imunógenos para preparação de vacinas podem contribuir para o fortalecimento de programas de prevenção. Adjuvantes que induzam aumento na resposta imune celular são desejados em programa controle da brucelose. Proteínas da membrana externa potencializam a atividade bactericida dos macrófagos e pesquisas para inclusão de adjuvantes específicos nas vacinas preconizadas poderiam ser incentivadas. Entretanto para doenças negligenciadas como a brucelose, novas vacinas, inativas ou vivas e diferenciadas, não possuem grande apelo comercial (Coria et al., 2016).

### **2.7.3 OIE**

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) proporciona transparência para todos os países membros em relação às situações sanitárias em seus respectivos países e fornece suporte técnico aos critérios utilizados no comércio internacional. A OIE respalda-se em diretrizes metodológicas científicas com a finalidade de harmonizar normas que abrangem a

sanidade animal. Regras claras com embasamento técnico proporcionam uma plataforma de comunicação para todos os autores envolvidos na cadeia produtiva. A eficiência dos programas de controle e a proteção para saúde pública é vital para o comércio seguro de animais, material genético e de produtos de origem animal. As informações sobre ocorrências sanitárias são públicas e estão disponíveis no site da OIE (Vallat, 2013).

Países membros concordam em notificar eventos de doenças que constam na lista da OIE assim como adotar medidas de controle previamente estabelecidas em seus respectivos territórios. Os métodos preconizados pela OIE são úteis para a padronização de exames laboratoriais, plano de contingência, medidas de prevenção, vacinações e notificações de doenças obrigatórias (Ragan et al., 2013).

O Brasil é signatário da OIE, dessa forma, o programa nacional de controle da brucelose deve se respaldar em normas técnicas conciliando com os princípios estabelecidos internacionalmente.

#### **2.7.4 PNCBET**

Apesar do controle da brucelose haver iniciado de modo incipientemente em 1944, foi a partir do ano 2000 que as medidas se tornaram mais efetivas por meio da vacinação obrigatória em bezerras e medidas voluntárias para a certificação de rebanhos livres ou monitorados, abate sanitário para animais reagentes em frigoríficos inspecionados, treinamentos para a habilitação de veterinários e realização de testes para a finalidade de reprodução, participação em eventos agropecuários e trânsito interestadual (Poester et al., 2002).

O Programa Nacional de Controle da brucelose e Tuberculose (PNCBET) é a estratégia utilizada para a redução da prevalência da brucelose no rebanho bovino e bubalino. No Brasil preconizou-se o uso de técnicas de diagnóstico como AAT, SAL e 2-ME como provas sorológicas oficiais (Greve et al., 2007) e o uso da vacinação com a B19.

Programas de educação sanitária (Plumb et al., 2013), laboratórios apropriados e pessoal qualificado para coletar e processar amostras devem ser considerados em programas de vigilância ativa (Seleem et al., 2010). Medidas como abate de animais reagentes, evitar criação de mais de uma espécie no mesmo espaço e manter taxas ínfimas de abortamentos contribuem para o controle da brucelose (Ning et al., 2013). Programas em países mais pobres

não irão obter sucesso enquanto serviços veterinários não estiverem estabelecidos e o trânsito dos animais não for controlado.

É recomendável que as ações sejam revisadas com determinada para frequência para monitorar a efetividade do programa. Samartino (2002) recomenda que o acompanhamento das medidas aplicadas seja realizado a cada três anos e que inquéritos epidemiológicos sejam delineados.

Oslen & Palmer, 2014 acreditam que a vacinação de rebanho reflete diretamente na redução de casos da brucelose em humanos. Portanto, uma vez que a vacinação e o sacrifício de reagentes, preconizados no PNCEBT, possuem a finalidade de reduzir a circulação do agente patogênico, o programa pode ter contribuído para a não propagação da brucelose em suínos.

#### **2.7.5 PNSS**

Além das ações preconizadas em bovinos, medidas preventivas e obrigatórias também estão incluídas no Programa Nacional de Sanidade Suína -PNSS, o qual inclui medidas específicas para a população de reprodutores suídeos, granjas de suínos e criatórios de subsistência. O controle é preconizado em todas as esferas da cadeia produtiva, desde a linhagem genética, rebanho comercial e abate. A inspeção contínua antes e durante o abate em frigoríficos de suínos é fundamental para o controle de diversas doenças.

A intensificação da suinocultura em escala industrial reduziu a prevalência das doenças em suínos de maior impacto econômico (Poester et al., 2002). No Brasil, não é permitida a vacinação contra brucelose em suínos e testes sorológicos periódicos são obrigatórios para a manutenção da certificação de granjas de suínos com a finalidade para reprodução para principais doenças que afetam a suinocultura (Brasil, 2013).

Para granjas de reprodutores de suínos alcançarem a certificação é necessário a comprovação de resultados sorológicos negativos. Exames laboratoriais periódicos semestrais são exigidos para Peste Suína Clássica, Doença de Aujeszky, Brucelose, Tuberculose, Leptospirose e trimestral para Sarna em Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas – GRSC (IN 19/2002, citado por Bianchi et al., 2006).

A cadeia produtiva da suinocultura está atenta a legislação sanitária e garante a biossegurança em rebanhos suínos. Programa sanitário eficiente, medidas de biossegurança e controle rígido do trânsito previne a entrada de inúmeros patógenos em granjas comerciais (Sindicato das Indústrias de Produtos Suínos, 2015).

Mas, apesar de não serem representativo economicamente, suínos de subsistência não podem ser preteridos no PNSS. Ações de vigilância se fazem necessárias para evitar risco de disseminação de doenças e a circulação de microrganismos patogênicos. A Norma Interna nº5 de 2009 do MAPA preconiza que a cada dois anos seja realizado inquérito epidemiológico no intuito de comprovar ausência de atividade viral do agente patogênico da peste suína clássica (PSC). O delineamento do tamanho da amostra baseia-se no número de criatórios de suínos cadastrado pelo sistema de defesa agropecuária da respectiva unidade federativa. O Brasil procura atender normas comerciais estabelecidas por órgãos internacionais, como a OIE e regulamentado pelo MAPA, com objetivo de manter a zona livre de PSC.

#### **2.7.6 Criatórios de Suínos**

O território do Distrito Federal apresenta área de 5.779,999 km<sup>2</sup> e o tamanho dos rebanhos nas propriedades rurais da UF é comumente reduzido (IBGE, 2016), assim pequenos produtores procuram atender várias finalidades: produção bovina destinada à produção de carne e leite, criações de pequenos ruminantes, aves e suínos, tanto para o consumo familiar quanto para negócios locais (Aguiar et al., 2006).

Não se exige comprovação de atestado negativo para brucelose em criatórios de suínos para o trânsito, uma vez que a movimentação para abate e engorda prescinde de atestados sanitários e a movimentação cuja finalidade é reprodução não é permitida entre criatórios. A movimentação de suínos para o abate ou engorda prescinde de atestado de saúde animal (Brasil, 2016b).

Acredita-se que o controle sanitário rígido em suídeos reprodutores (Brasil, 2002), o acompanhamento pelo responsável técnico em granjas comerciais e assistência por veterinários autônomos (Sindicato das Indústrias de Produtos Suínos, 2015) e pelo serviço veterinário oficial (Brasil, 2002), contribuem para manter a sanidade do rebanho suíno no Distrito Federal.

Em função do trânsito para a finalidade reprodução com origem em explorações comerciais ou de subsistência não ser permitido (Brasil, 2016b), produtores de suínos que

possuem a intenção de migrar da subsistência para o mercado de consumidores locais, precisam se adequar à legislação e uma das medidas seria, entre outras, adquirir reprodutores de granjas certificadas (Brasil, 2002).

As pequenas propriedades de subsistência costumam adotar o sistema contínuo, no qual alguns dos leitões, quando atingem a maturidade sexual, são utilizados como matrizes ou varrões, não adquirindo suínos de granjas de reprodutores. Cabe ao serviço veterinário oficial realizar o acompanhamento destas movimentações e realizar orientações sanitárias. Esses novos produtores passam então a conhecer as normas que precisam atender para continuar a atividade, incluindo a exigência da GTA, a qual poderá ser emitida pela internet, desde que as informações de seu rebanho estejam atualizadas no sistema de defesa agropecuária (Brasil, 2016c).

A Secretaria de Agricultura do Distrito Federal - SEAGRI-DF realiza o cadastro dos produtores rurais e suas explorações de rebanhos. Muitas vezes, proprietários que não possuem conhecimento sobre a legislação sanitária são orientados e realiza-se o cadastramento destes. Observou-se crescente aumento da população de suínos para subsistência nos últimos anos. Em 2011 o sistema operacional de defesa agropecuária apontou 565 criatórios e 7.047 suínos; em 2012 foram cadastrados mais 300 criatórios com 14.600 suínos. Aumento dos cadastros também foi registrado em 2014, quando o número de criatórios passou para 1.665 e 18.749 suínos (Brasil, 2016c).

Acredita-se que um dos fatores que proporcionou o aumento do registro de criatórios suínos não foi essencialmente o aumento de animais, mas sim a intensificação da atuação do serviço veterinário oficial em realizar novos cadastros. Fiscalizações a campo e em atividades de educação sanitária permitiram a inclusão de cadastros de criatórios que antes não estavam registrados no sistema operacional e incentivam a vinda de produtores em escritórios de defesa agropecuária.

Em 2016, registrou-se uma redução de 7,6 % dos cadastros ativos e queda de 14% dos animais. O aumento do preço dos insumos e a dificuldade de mão de obra foram os fatores que favoreceram o fim da atividade por estes produtores. Em 2010, segundo dados estatísticos da revista rural, o preço médio da saca de milho de 60 kg estava cotado em R\$ 21,51 e hoje a cotação da saca de milho de 60 kg para o DF é \$43,03. Aliado ao alto custo de produção, a coibição do abate na propriedade e a dificuldade ao acesso independente também foram relatados por proprietários como causa da inativação do cadastro. Ainda, aqueles criadores

com alto grau de vulnerabilidade e que não se enquadraram nos requisitos mínimos de higiene optaram por não criar mais suínos ao invés de atenderem as orientações sanitárias.

O PNSS lista diretrizes para fiscalizações no campo como inquéritos epidemiológicos em criatórios de suínos e vigilância ativa para a Peste Suína Clássica (PSC). Apesar de não preconizar ações específicas para brucelose, ocorrências sanitárias direcionam tomada de ações da defesa agropecuária. Ao visitar propriedades de risco, eventos relacionados a sanidade são registrados e investigados. Condições de higiene ruins e instalações de trabalho desfavoráveis contribuem para aumentar o risco de contaminação (Ortegón et al., 2003). Orientações relacionadas tanto a biossegurança quanto a normas estabelecidas em legislação sanitária são esclarecidas para os proprietários de suínos.

Poucos estudos foram conduzidos em criatórios de suínos na região centro-oeste (Matos et al., 2004), sendo necessário o conhecimento da situação epidemiológica nas propriedades de subsistência localizadas no planalto central. O presente trabalho contribuirá com o conhecimento da situação epidemiológica da brucelose no DF. A pesquisa pode ser utilizada como uma ferramenta de gestão na criação de suínos, uma vez que pode auxiliar na tomada de decisão para medidas de controle desta doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

Estimar a soro prevalência da brucelose em criatórios de suínos no DF.

#### **3.2 Específicos:**

1. Identificar características atuantes como fatores de risco ou proteção;
2. Identificar elementos que permitam ampliar ou orientar a sensibilidade do sistema de vigilância ativa.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, D.A.; MOSCARD-COSTELLO, J.; DICKSON, E.; HARWOOD, R.; BURNS, K.; McKILLOP, E.; et al. Epidemiology and management of a bovine brucellosis cluster in Northern Ireland. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 98, p. 223–229.

ABRIL, C.; THOMANN A.; BRODARD, I.; WU, N.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; FREY, J.; OVERESCH, G. Novel isolation method of *brucella* species and molecular tracking of *brucella suis biovar 2* in domestic and wild animals. **Veterinary Microbiology**, vol. 150, p. 405–410.

ADAMS, L.G. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p.553–561, 2002.

ADONE, R.; PASQUALI, P.; Epidemiosurveillance of brucellosis. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol. 32, n.1, p. 199-205, 2013.

ADONE, R.; MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; FRANCA, M.; TARANTINO, M. Antigenic, Immunologic and Genetic Characterization of Rough Strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. **PLoS ONE** vol. 6, n. 10, e24073, 2011.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; DIB C.C.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; et al. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura familiar do município de monte negro, RO. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol.73, n.4, p.415-419, 2006.

AL DAHOUK, S.; NOCKLER, K.; HENSEL A.; TOMASO, H.; SCHOLZ H.C.; HAGEN, R.M.; NEUBAUER, H. Human brucellosis in a nonendemic country: a report from Germany, 2002 and 2003. **Europe Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, vol. 24, p.450–456, 2005.

AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHOLZ, H.C.; NEUBAUER, H. Identification of *Brucella* Species and Biotypes using; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment; Length Polymorphism (PCR-RFLP). **Critical Reviews in Microbiology**, vol.31, p.191–196, 2005.

AL DAHOUK, S.; CKLER, K.; SCHOLZ, H.C.; PFEFFER, M.; NEUBAUER, H.; TOMASO, H. Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, vol.45, n.11, p.1464–1470, 2007.

AL DAHOUK, S.; NOCKLER, K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy **Expert Review of Anti-infective Therapy**, vol. 9, n.7, p.833-841, 2011.

ALEIXO, M.J.; FERREIRA, M.L.; ANTUNES, F. Brucellosis. **Acta Med. Port.** vol. 12, n.12, p.323-30. 1999.

ALLEN, C.A.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. Transposon-derived *brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival **Infection and Immunity**, vol.66, n.3, p.1008–1016, 1998.

AMARAL, L.A.; ROSSI, O.D.; NADER FILHO, A.JR.; DE SOUZA, M.C.I; ISA, H. Risco à saúde humana e animal. **ARS Veterinária**, vol. 21, n.1, p.41-46, 2005.

APARÍCIO, E.D. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. **Review Scientifics Techniques Office International Epizootias**, vol. 32 n.1, p. 43-51, 2013.

[Digite aqui]

ARELLANO-REYNOSO, B.; LAPAQUE, N.; SALCEDO, S.; BRIONES G.; CIOCCHINI, A.E.; UGALDE, R.; ET AL. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. **Nature Immunology**, vol.6, n.6, p.618-625, 2005.

ARAÚJO, B.R.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S.; LIMA, C.C.V.; LEITE, M.D.X.; NETO, A.O.C., et al. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. (2), pp.129-135, 2013

ASMARE, K.; SIBHAT, B.; MOLLA, W.; AYELET, G.; SHIFERAW, J.; MARTIN, A.D. et al. The status of bovine brucellosis in Ethiopia with special emphasis on exotic and cross bred cattle in dairy and breeding farms. **Acta Tropical**, n.126, p.186– 192, 2013.

AUDIC, S.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J.M.; CLOECKAERT, A. ZYGMUNT, M.S. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*. **BioMed Central Evolutionary Biology**, vol.11, n. 200, p.1471-2148, 2011.

BAEK, B.K.; LIM, C.W.; RAHMAN, M.S.; KIM, C.H.; OLUOCH, A.; KAKOMA, I. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. **Canine Journal Veterinary Research**, vol. 67 n.4, p.312–314, 2003.

BAGUES, M.P.J.; TERRAZA, A.; GROSS, A.; DORNAND, J. Different Responses of Macrophages to Smooth and Rough *Brucella* spp.: Relationship to Virulence. **Infection and Immunity**, vol. 72, n .4, p.2429–2433, 2004.

BALANÇO DO MERCADO E COTAÇÃO DO PREÇO DO MILHO. **Revista Rural** [http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2011/Artigos/rev155\\_balanco\\_mercado.htm](http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2011/Artigos/rev155_balanco_mercado.htm). Acesso em 18 out 2016

BALDWIN, C.L.; PARENT, M. Fundamental of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p.367-382, 2002.

BANAI, M.; ADAMS, L.G.; DANGOTT, L.J.; FREY, M.; FICHT, T.A. *Brucella* attenuation and relevance to vaccine properties. **Small Ruminant Research** vol. 45, p. 129–137, 2002.

BARTHASSON, D.L. Perfil sanitário de suínos de criações extensivas do Estado de Goiás. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, **Universidade Federal de Goiás**, 84p. 2005.

BAUMGARTEN, D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p. 63–69, 2002.

BERNARD, F.; VINCENT, C.; MATTHIEU, L.; DAVID, R.; JAMES, D. Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara milk basin (Uganda). **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 67, p. 267–281, 2005.

BIANCHI, I.; SCHAAF, S.; CORRÊA, E.K; PERONDI, A.; LUCIA, T. JR.; DECHAMPS, J.C. et al. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 30, n.1/2, p.72-77, 2006.

BLASCO, J.M. A review of the use of *b. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. **Preventive Veterinary Medicine**, vol 31, p. 275-283, 1997.

BLASCO, J.M. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, vol. 62, p. 33–37, 2006.

[Digite aqui]

BLASCO, J.M; MOLINA-FLORES. Response to letter to the editor. **Preventive Veterinary Medicine**, vol 94, p. 158-162, 2010.

BLASCO, J.M; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *brucella melitensis* infection in sheep and goats. **Veterinary Clinical Food Animal**, vol. 27, p. 95-104, 2011.

BRAGA, J.F.V.; TEIXEIRA, M.P.F.; FRANKLIN, F.L.A.A.; SOUZA, J.A.T.; SILVA, S.M.M.S.; GUEDES, R.M.C. Soroprevalência de pseudorraiva, peste suína clássica e brucelose em suínos do estado do Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 65, n.5, p. 1321-1328, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, vol.30, p.39–50, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA Nº 19 DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna nº 5**, de 20 de outubro de 2010. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 27**, de 20 de outubro de 2010. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 50**, de 24 de setembro de 2013. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 19**, de 3 de novembro de 2016. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016a .

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de preenchimento para emissão de guia de trânsito animal (GTA) para suídeos versão 9.0**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/transito>. Acesso em 18 out 2016b.

BRASIL, Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural. **SIDAGRO – SISTEMA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO DF** <http://sidagro.seagri.df.gov.br/sidagro/login.seam> Acesso em 21 out 2016c.

BRICKER, B.J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.435–446, 2002.

CASTRO, H.A; GONZÁLEZ, S.R.; PRAT, M.I.; BALDI, P.C. Detección de anticuerpos anti-*Brucella* spp. en cerdos mediante técnicas de aglutinación y ELISA indirecto en las provincias de Buenos Aires y La Pampa, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, vol.38, p.75-78, 2006.

CATLEY, A. Use of participatory epidemiology to compare the clinical veterinary knowledge of pastoralists and veterinarians in East Africa. **Tropical Animal Health Production**, vol. 38, p.171–184, 2006.

CELLI, J.; GORVEL, J.P. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. **Current Opinion in Microbiology**, vol.7 p. 93–97, 2004.

[Digite aqui]

CHACÓN-DÍAZ, C; MUÑOZ-RODRÍGUEZ, M.; BARQUERO-CALVO, E.; GUZMÁN-VERRIA, C.; CHAVES-OLARTE, E., GRILLÓ, M. J. et al. The use of green fluorescent protein as a marker for *Brucella* vaccines. **Vaccine**, vol. 29, p. 577–582, 2011.

CLOECKAERT, A.; VERGER, J.M.; GRAYON, M.; PAQUET, J-Y.; GARIN-BASTUJI, B.; FOSTER, G.; et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. **Microbes Infection**, vol. 3, p. 729-738, 2001.

CLOECKAERT, A.; VISCAÍNO, N.; PAQUET, J-Y.; BOWDEN, R.A.; ELZER, P.H. Major out membrane proteins of *Brucella* spp.: past present and future. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p. 229-247, 2002a.

CLOECKAERT, A.; ZYGMUNT, M.S.; GUILLOTEAU, L.A. *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. **Vaccine**, vol.20, p.1820–1822, 2002b.

CLOECKAERT, A.; JACQUES, I.; GRILLÓ, M.J.; MARIN, C.M.; GRAYON, M.; BLASCO, J.M. et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. **Vaccine**, vol. 22, p. 2827–2835, 2004.

CORBEL, M.J. International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Report of the meeting 5th September 1986, Manchester, England. **International Journal Systematic Bacteriology**, vol. 38, p. 450-452, 1988.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an overview. **Emerging Infection Disease**, vol.3, p. 213–221, 1997.

CORIA, L.M.; IBANEZ, A.E.; PASQUEVICH, K.A.; COBIELLO, P.L.G.; FRANK, F.M.; GIAMBARTOLOMEI, G.H; CASSATARO, J. *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with na antigen enhances antigen-specific Thelper1 memory responses and induces protection against parasite challenge. **Vaccine**, vol.34 p.430–437, 2016.

CUTLER, S.J.; WHATMORE, A.M.; COMMANDER, N.J. Brucellosis - new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 98, p.1270–128, 2005.

CZIBENER, C.; DEL GIUDICE, M. G.; SPERA, J. M.; FULGENZI, F. R.; UGALDE, J. E. Delta-pgm, a new live-attenuated vaccine against *Brucella suis*. **Vaccine**, vol. 34, p.1524–1530, 2016.

DAVID, R. An unconventional exit for *Brucella*. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 10, p. 27-9, 2012

DEQIU, S.; DONGLOU X.; JIMING, Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.165–82, 2002.

DIAS, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; LIMA, Z.M.B.; PAULIN, L.M.S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 61, supl.1, p.118-125, 2009.

DIAZ, R.; CASANOVA, A.; ARIZA, J.; MORIYON, I. The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease **PLoS Neglected Tropical Disease**, vol. 5, n.4, e950, 2011.

DIESTE-PÉREZ, L.; FRAILE, L.; DE MIGUEL, M.J.; BARBERÁN, M.; BLASCO, J.M.; MUÑOZ, P.M. Studies on a suitable antibiotic therapy for treating swine brucellosis. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, vol.38, p. 357-364, 2014.

DIESTE-PÉREZ, L.; BARBERÁN, M.; MUÑOZ, P.M; MORIYÓN, I.; BLASCO, J.M. Clinical and histological features of brucellin skin test responses in *Brucella suis* biovar 2 infected pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 163, p. 77–85, 2015a.

DIESTE-PÉREZ, L.; BLASCO, J.M.; DE MIGUEL, M.J.; MORIYÓN, I.; MUÑOZ, P.M; Diagnostic performance of serological tests for swine brucellosis in the presence of false positive serological reactions. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 111, p. 57–63, 2015b.

DUCROTOY, M.J.; BERTU, W.J.; OCHOLI, R.A.; GUSI, A.M.; BRYSSINCKX W.; WELBURN, S. et al. Brucellosis as an Emerging Threat in Developing Economies: Lessons from Nigeria. **PLoS Neglected Tropical Disease**, vol.8, n.7, e3008, 2014.

ERGONUL, O.; CELIKBAS, A.; TEZEREN, D.; GUVENER, E.; DOKUZOGUZA, B. Analysis of risk factors for laboratory-acquired brucella infections. **Journal of Hospital Infection**, vol. 56, p. 223–227, 2004.

ESCOBAR, G. I.; JACOB, N.R.; LÓPEZ, G.; AYALA, S.M.; WHATMORE, A.M.; LUCERO, N.E. Human brucellosis at a pig slaughterhouse. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 36, p. 575– 580, 2013.

EWALT, D.R. Comparison of three culture techniques for the isolation of *Brucella abortus* from bovine supramammary lymph nodes. **Journal Veterinary Diagnosis Investigation**, vol.1, p.227–230, 1989.

FALENSKI, A.; MAYER-SCHOLL, A.; FILTER, M.; GÖLLNER, C.; APPEL, B.; NÖCKLER, K. Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, vol.145, p.326–330, 2011.

FERNANDEZ-PRADA, C.M.; NIKOLICH, M.; VEMULAPALLI, R.; SRIRANGANATHA, N.; BOYLE, S.M.; SCHURIG, G.G. Deletion of *wboA* Enhances Activation of the Lectin

FERREIRA, L.; CASTAÑO, S. V.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GONZÁLEZ-CABRERO, S., MENEGOTTO, F. et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. **PLoS ONE**, vol.5, n.12, 2010.

FILIPPSEN, L.F.; LEITE, D.M.G.; DA SILVA, A.; VARGAS, G.A. Prevalência de doenças infecciosas em rebanho de suínos criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.31, n.2, p.299-302, 2001

FOSTER, G.; MacMILLAN, A.P.; GODFROID, J.; HOWIED, F. ROSSA, H. M.; CLOECKAERTE, A. et al. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p. 563–580, 2002.

FOSTER, G.; OSTERMAN, B.S.; GODFROID, J.; JACQUES, I.; CLOECKAERTE, A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 57, p. 2688–2693, 2007.

FOSTER, J.T.; BECKSTROM-STERMBERG, S.M.; PEARSON, T.; BECKSTROM-STERMBERG, J.S.; CHAIN, P.S.G.; ROBERTO, F.F. et al. Whole-Genome-Based Phylogeny and Divergence of the Genus *Brucella*. **Journal of Bacteriology**, vol.191, n.8, p.2864–2870, 2009.

[Digite aqui]

FRANCO, M.P.; MULDER, M.; GILMAN, R.H.; SMITS, H.L Human brucellosis. **Lancet Infection Disease**, vol 775–86, n.7 2007.

FREER, E.; ROJAS, N.; WEINTRAUB, A.; LINDBERG, A.A.; MORENO, E. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. **Research Microbiology**, vol. 146, p.569-578, 1995.

FREITAS, J.A.; GALINDO, G.A.R.; DOS SANTOS, C.E.J.; SARRAF, K.A.; OLIVEIRA, J.P. Risco da brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista de Saúde Pública**, vol.35, n.1, p.101-102

FRETIN, D.; MORI, M.; CZAPLICKI, G., QUINET, C.; MAQUET, B.; GODFROID., et al. Unexpected *Brucella suis* Biovar 2 Infection in a Dairy Cow. **Belgium Infectious Diseases**, vol. 19, n. 12, 2013

FUGIER, E.; PAPPAS, G.; GORVEL, J.P. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. **Expert Review in Molecular Medicine**, vol.9; n. 35, 2007.

GALUZO, I.G. Development of the Theory of Natural Focality of Diseases, **Vet. Akad. Nauk KazSSR**, 1969, n.10, p. 30–35.

GANESH, N.V.; SADOWSKA, J.M.; SARKAR, S.; HOWELLS, L. McGIVEN, J.; BUNDLE, D.R. Molecular Recognition of Brucella A and M Antigens Dissected by Synthetic Oligosaccharide Glycoconjugates Leads to a Disaccharide Diagnostic for Brucellosis. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 136, p.16260–16269, 2014.

GARCÍA-JUÁREZ, G.; RAMÍREZ-BRIBIESCA, J. E.; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, M.; HERNÁNDEZ-CALVA, L.M.; DÍAZ-APARICIO, E.; OROZCO-BOLAÑOS, H. Análisis de riesgos de la brucellosis en el estado de Tlaxcala. **Salud Pública del México**, vol. 56, n. 4, p.355-362, 2014.

GARRO, E.; DELGADO, A.; EVARISTO, R.; MANCHEGO, A. Prevalencia de brucelosis caprina en la provincia de Barranca, Lima. **Revista Investigación Veterinaria Perú**, vol.16, n.2, p.184-186, 2005.

GODFROID, J. Brucellosis in wildlife. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.21, n.2, p.277-286, 2002.

GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p.135-145, 2002.

GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.-P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, D. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis **Veterinary Research**, vol. 36, p. 313–326, 2005.

GODFROID, J.; SCHOLZ, H.C.; BARBIERD, T.; NICOLAS, P.; WATTIAUE, D. FRETINE, A.M. Brucellosis at the animal ecosystem human interface at the beginning of the 21st century. **Preventive Veterinary Medicine**, vol.102, p.118– 131, 2011.

GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTHF, F. MATOPE, G.; MUMAH, J. et al. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** vol.36, p.241-248, 2013.

[Digite aqui]

GONZÁLEZ, D.; GRILLÓ, M.-J.; DE MIGUEL, M.-J.; ALI, T. ARCE-GORVEL, V.; DELRUE, R.-M.; et al. Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. **PLoS ONE**, vol. 3, n.7, e2760, 2008.

GOOD, S.E.; SMITH, W.V. *Bacillus abortus* (bang) as an etiological factor in infectious abortion in swine. From the Laboratory of the Department of Animal Husbandry, Kentucky Agricultural Experiment Station, Lexington, Kentucky. In: SURFACE, F.M. A Note on the Maintenance of Virulence by *Bacillus abortus* (Bang), **Journal of Infectious Diseases**, 1913, 12, p. 359.

GOODWIN, Z.I.; PASCUAL, D.W. Brucellosis vaccines for livestock. **Veterinary Immunology and Immunopathology** <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.011>(2016).

GORTÁZAR, C.; FERROGLIO, E.; HÖFLE, URSULA; FRÖLICH, K; VICENTE, J. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. **European Journal Wildlife Research**, vol. 53, p. 241–256, 2007.

GORVEL, J.P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p.281–297, 2002.

GORVEL, J.P. *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jekyll. **Microbes and Infection**, vol.10, p.1010-1013, 2008.

GREVE, I.C.; ZERBINATI, J., LEAL, R.F.; AMORIM, L.M.P.V.; SILVA, D.L.; OLIVEIRA, E.M.D.; et al. Estudo comparativo da sensibilidade e especificidade dos testes antígeno acidificado tamponado (AAT) e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Revista acadêmica de Curitiba**, v.5, n.3, p.255-263, 2007.

GUDOSHNIK, A.N. Role of pasture ticks in circulation of the causative agent of brucellosis. **Extended Abstract of Cand. Sci.** (biol.) Dissertation, omsk, 1959.

GUZMAN-VERRI, C., MANTEROLA, L., SOLA-LANDA, A., PARRA, A., CLOECKAERT, A., GARIN, J.; et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. **Proceeds National Academic Science**, vol. 99, p. 12375–12380, 2002.

HAFEZ, E.S. **Reprodução Animal**, 6ª ed., São Paulo, 582 p., 1995.

HANAM, P.; KHAIRNAR, K.; DOWNEY, J.; POWIS, J.; RALEVSKI, S.; PILLAI, D.R. *Brucella Suis* Infection In Dogs, Georgia, USA. **Emerging infectious diseases**, vol.17, n.12, 2011.

HÄNSEL, C.; MERTENS, K.; ELSCHNER, M.C.; MELZER, F. Novel real-time PCR detection assay for *brucella suis*. **Veterinary Record Open** vol. 2, e000084, 2015;

JELASTOPULU, E.; BIKAS, C.; PETROPOULOS, C.; LEOTSINIDIS, M. Incidence of human brucellosis in a rural area in western Greece after the implementation of a vaccination programme against animal brucellosis. **BMC Public Health**, vol.8, p.241-258, 2008.

JESUS, V.L.T.; PEREIRA, R.C.G.; MEIRELES, G.S.; RODRIGUES, J.L.; JORGE, J.L.B.P.; FLAUSINO; W. Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, vol. 32, n.2, p.101-104, 2010.

JUNGERSEN, G.; SORENSEN, V.; GIESE, S.B.; STACK, J.A.; RIBER, U. Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 after natural or experimental infection in pigs. **Epidemiology and Infection**, vol. 134, n.2, p.347–357, 2006.

KANG, S-I.; HER, M.; KIM, J. W.; KIM, J-Y.; KO, K.Y.; HA, Y-M. et al. Advanced multiplex pcr assay for differentiation of *brucella* species **Applied and Environmental Microbiology**, vol.77, n.18, p.6726–6728, 2011.

KANSIIME, C.; ATUYAMBE, L.M.; ASIIMWE, B.B.; MUGISHA, A.; MUGISHA, S.; GUMA, V. et al. Community perceptions on integrating animal vaccination and health education by veterinary and public health workers in the prevention of brucellosis among pastoral communities of south western Uganda. **PLoS ONE**, vol.10, n.7, e0132206, 2015.

KAUR, G.; VERMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, D.; AGRAWAL, R. K. Cloning, expression and characterisation of recombinant outer membrane protein 16 from *Brucella spp.* **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B Biological Sciences**. vol. 85, n.3, p.853–858.

KITTELBERGER, R.; HILBINK, F.; HANSEN, M.F.; PENROSE, M.; DE LISLE, G.B.; LETESSON, J-J et al. Serological crossreactivity between *brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 I immunoblot analysis of the antibody response to *Brucella* protein antigens in bovine brucellosis. **Veterinary Microbiology**, vol. 47, p.257-270, 1995.

KÖHLER, S., FOULONGNE, V.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; BOURG, G.; TEYSSIER, J.; RAMUZ, M. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **PNAS**, vol.99, n.24, p.15711-15716, 2002.

KÖHLER, S., MICHAUX-CHARACHON, S.; PORTE, F.; RAMUZ, M.; LIAUTARD, J. P. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? **Trends Microbiology**, vol. 11, p. 215–219, 2003.

KÖPPEL, C.; KNOPF, L.; RYSER, M.P.; MISEREZ, R.; THÜR, B.; STÄRK, K. D. C. Serosurveillance for selected infectious disease agents in wild boars (*sus scrofa*) and outdoor pigs in Switzerland. **European Journal Wildlife Research**, vol.53, P.212–220, 2007.

KREIZINGER, Z.; FOSTER, J.T.; B, RONAI, Z.; SULYOK, K. M.; WEHMANN, E.; JÁNOSI S.; GYURANECZ, M. Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. **Veterinary Microbiology**, vol.172 p. 492-498, 2014.

KUNDA, J.; FITZPATRICK, J.; KAZWALA, R.; FRENCH, N.P.; SHIRIMA, G.; MacMILLAN, A. Health-seeking behaviour of human brucellosis cases in rural Tanzania. **BioMed Central Public Health**, vol.7, p. 315-322, 2007.

KUTLU, M.; CEVAHIR, N.; ERDENLIG-GÜRBILEK, S.; AKALINA, S.; UCAR, M. SAYIN-KUTLU, S. The first report of *Brucella suis* biovar 1 isolation in human in Turkey. **Journal of Infection and Public Health**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.01.011> 1876-0341

LA ROSA, R.D.G.; HEREDIA, O. R.; RODRÍGUEZ, C.C.; ARRUTI, A.P.; CABRERA, I.S. Educational intervention on the subject of food-borne diseases with health technology students, **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, vol.50, n.2, p.213-221, 2012.

LAPAQUE, N.; MORIYON, I.; MORENO, E.; GORVEL, J-P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current Opinion in Microbiology**, vol.8, p.60–66, 2005.

LEISER, O.P.; CORN, J. L., SCHMIT, B.S.; KEIM, P.S.; FOSTER, J.T. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. **Veterinary Microbiology**, vol.166, p. 1-10, 2013.

[Digite aqui]

LEITE, R.M.H.; THOMPSON, J.A.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; LAGE, A.P. A random sample survey of bovine brucellosis in the state of paraíba, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol.40, p.170-174, 2003.

LEITE, A.I.; COELHO, W.A.C.; SILVA, G.C.P.; SANTOS, R.F.; MATHIAS, L.A. DUTRA, I.S. Prevalência e fatores de risco para brucelose suína em Mossoró-RN. **Pesquisa veterinária brasileira**, vol. 34 n.6, p. 537-541, 2014.

LETESSON, J-J.; LESTRATE, P.; DELRUE, R.M.; DANESE, I.; BELLEFONTAINE, F.; FRETIN, B. et al. Fun stories about *Brucella*: the "furstive nasty bug". **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.317-328, 2002.

LINDAHL, E.; SATTOROV, N.; BOQVIST, S.; MAGNUSSON, U. A study of knowledge, attitudes and practices relating to brucellosis among small-scale dairy farmers in an urban and peri-urban area of Tajikistan. **PLoS ONE**, vol.10, n.2, e.0117318.

LISTA, F.; REUBSAET, F.A.G.; SANTIS, R.; PARCHEN, R.R.; JONG, A.D.L; KIEBOOM, J. et al. Reliable identification at the species level of brucella isolates with MALDI-TOF-MS. **BioMed Central Microbiology**, vol.11, p.267-278, 2011.

LORD, V.R.; CHERWONOGRODZKY, J.W.; MARCANO, M.J.; MELENDEZ, G. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.35, n.1, p.295–297, 1997.

LUNA-MARTÍNEZ, J. E.; MEJÍA-TERÁN, C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.19-30, 2002.

MARTINS, R.C.; GAMAZO, C.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M.; BARBERÁN, M.; PEÑUELAS, I.; IRACHE, J.M. Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, vol.162, p. 553–560, 2012.

MATOPE, G.; BHEBHE E.; MUMAC, J.B.; LUND, A; SKJERV, E. Herd-level factors for *Brucella* seropositivity in cattle reared in smallholder dairy farms of Zimbabwe. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 94, p. 213-221, 2010.

MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J.; PÔRTO, R.N.G.; MEIRINHOS. M.L.G. Ocorrência de anticorpos para *brucella sp.* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia, estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** vol. 5, n.2, p.105-108, 2004.

McDERMOTT, J.J.; ARIMI, S.M. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.111-134, 2002.

McDERMOTT, J.J.; GRACE, D.; ZINSSTAG, J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol. 32, n.1, p.249-261, 2013.

McGIVEN, J.A.; NICOLA, A.; COMMANDER, N.J.; DUNCOMBE, L. TAYLOR, A.V.; VILLARI, S. et al. An evaluation of the capability of existing and novel serodiagnostic methods for porcine brucellosis to reduce false positive serological reactions. **Veterinary Microbiology**, vol.160, p.378–386, 2012.

McGIVEN, J.; HOWELLS, L.; DUNCOMBE, L.; STACK, J.; GANESH, N.V.; GUIARD, J. et al. Improved serodiagnosis of bovine brucellosis by novel synthetic oligosaccharide antigens representing

[Digite aqui]

the capping M epitope elements of *Brucella* O-polysaccharide. **Journal Clinical Microbiology**, vol.53, p.1204–1210, 2015.

McQUISTON, J.R.; VEMULAPALLI, R.; INZANA, T.J.; SCHURIG, G.G.; SRIRANGANATHAN, N.; FRITZINGER, D. et al. **Infection and Immunity**, vol. 67, p. 3830–3835, n.8, 1999. Homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence

MEADOR, V.P.; DEYOE, B.L. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. **Veterinary Pathology**, vol. 26, p.513–515, 1989.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A.J. Avaliação das provas de soroaaglutinação rápida, soroaaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, vol.37, n.5, 2000.

MEISEL, S. STÖCKEL, S.; ELSCHNER, M.; MELZER, F.; RÖSCH, P.; POPP, Y. Raman Spectroscopy as a potential tool for detection of *brucella* spp. in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.7, n.8, p. 5575–5583, 2012.

MEKONNEN, H.; KALAYOU, S.; KYULE, M. Serological survey of bovine brucellosis in barka and arado breeds (*Bos indicus*) of Western Tigray, Ethiopia. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 94, p.28-35, 2010.

MEMISOGLU, K.; YUMUK, Z.; AKANSEL, GÜR. An unusual presentation of brucellar septic arthritis involving the knee joint with extraarticular hardware: A case report. **The Knee**, vol.15, p.148–150, 2008.

MEYER, M. Evolution and taxonomy in the genus brucela: brucellosis of rodents. **Theriogenology**, vol.6, n.2-3, 1976.

MIRANDA, K.L.; POESTER, F.P.; DORNELES, E.M.S.; RESENDE, T.M.R.; VAZ, A. K.; FERRAZ, S.M. *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. **Acta Tropica**, vol.160, p.58–61, 2016.

MONREAL, D.; GRILLÓ, M. J.; GONZÁLEZ, D. MARÍN, C.M.; MIGUEL, M.J.; LÓPEZ-GONI, I. et al. Characterization of *brucella abortus* o-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *brucella abortus* and *brucella ovis* in the mouse model. **Infection and Immunity**, vol.71, n.6, p.3261–3271, 2003.

MONTEIRO, L.A.R.C; PELLEGRIN, A.O.; ISHIKAWA, M.M.; OSÓRIO, A.L.A.R. Investigação epidemiológica da brucelose bovina em um estrato do Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 26, n. 4, p.217-222, 2006.

MORENO, E. Brucellosis in Central America. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.31-38, 2002.

MORENO, E.; CLOECKAERT, A.; MORIYON, I. Brucella evolution and taxonomy. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.209-227, 2002.

MOTA, P.M.C.; JR FONSECA, A.A.; OLIVEIRA, A.M.; NASCIMENTO, K.F.; FILHO SOARES, P.M. Inquérito soroepidemiológico para brucelose em suídeos do Brasil. **Veterinária em Foco**, vol.7, n.2, p.141-147, 2010.

MUMA, J.B.; SAMUI, K.L; OLOYA, J.; MUNYEME, M.; SKJERVE, E. Risk factors for brucellosis in indigenous cattlereared in livestock–wildlife interface áreas of Zambia. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 80, p.306-317, 2007.

[Digite aqui]

MUMA, J.B.; LUND, A.; NIELSEN, K.; MATOPE, G.; MUNYEME, M.; MWACALIMBA, K. et al. Effectiveness of Rose Bengal test and fluorescence polarization assay in the diagnosis of *Brucella* spp. infections in free range cattle reared in endemic areas in Zambia. **Tropical Animal Health Production**, vol. 41, p.723–729, 2009.

MUÑOZ, P.M.; BOADELLA, M.; ARNAL M.; DE MIGUEL, M.J.; REVILLA, M.; MARTINEZ, D. et al.; Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. **Bio Med Central Microbiology Infectious Diseases**, vol.10, n. 5, p.1-14, 2010.

MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; ENGEL, B.; MIGUEL, M.J.; MARÍNA, C.M.; DIESTE, L.; et al. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol.146, p.150– 158, 2012.

NIELSEN, K.; The Serological Response of Cattle Immunized with *Yersinia enterocolitica* 0:9 or O<sup>16</sup> to *Yersinia* and *Brucella abortus* Antigens in Enzyme Immunoassays. **Veterinary Immunopathology**, vol.24, p.373-382, 1990.

NIELSEN, K.; KELLY, L.; GALL, D.; NICOLETTI, P.; KELLY, W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Veterinary Immunopathology** vol.46, p. 285-291, 1995

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, vol.9, p.447-459, 2002.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; JUNGENSEN, G.; STACK, J.; et al. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella* sp. and *Yersinia enterocolitica* 0:9 in cattle and pigs. **Veterinary Immunopathology**, vol.109, p.69-78, 2006.

NING, P.; GUO, M.; GUO, K.; XU, L.; REN, M.; et al. Identification and Effect Decomposition of Risk Factors for *Brucella* Contamination of Raw Whole Milk in China. **PLoS ONE**, vol.8, n.7, e68230, 2013.

NYMO, I.H.; TRYLAND, M.; GODFROID, J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). **Veterinary Research**, vol.42, n.93, 2011.

NYMO, I.H.; GODFROID, J.; ÅSBAKK, K.; ANETT, K.L.; TRYLAND, M.; NEVES, C.G.; et al. A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Brucella* antibodies in Arctic wildlife. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 25, n.3, p.369–375, 2013.

OGATA, R.A.; GONÇALVES, V.S.P.; FIGUEIREDO, V.C.F.; LÔBO, J.R.; RODRIGUES, et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.61, supl. 1, p.126-134, 2009.

OLIVEIRA, S.J. Microbiologia Veterinária. **Guia bacteriológico prático**. 2ª edição. Editora da Ulbra, 2000

OLSEN, S.C.; PALMER, M.V. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50years. **Veterinary Pathology**, vol. 51, p. 1076–89, 2014

OMER, M. K.; SKJERVE, E. WOLDEHIWET, Z; HOLSTAD, G. Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. **Preventive Veterinary Medicine**. vol. 46, p. 257-265, 2000.

[Digite aqui]

ORTEGÓN, D.F.; BAYONA <sup>†</sup>, D.A.C. Seroprevalencia de brucelosis en trabajadores de mataderos de municipios del Tolima (Colômbia). **Revista Ciencia Salud / Bogotá**. vol. 2, n.1. p. 15-23, 2004.

OSTERMAN, B.; MORIYON, I.; International committee on systematics of prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting 17th September, 2003, Pamplona, Spain. **International Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. vol. 56, p. 1173-1175, 2006.

PAPPAS, G.; AKRITIDIS, N.; BOSILKOVSKI, M.; TSIANOS, E. Brucellosis. **New England Journal Medicine**, vol.352, p.2325–2336, 2005

PAPPAS, G. The changing brucella ecology: novel reservoirs, new threats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 36, p. s8–s11, 2010.

PAULO, P.S.; VIGLIOCCO, A.M.; RAMONDINO, R.F.; MARTICORENA, D.; BISSI, E., BRIONES, G.; et al. Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina. **Clinical Diagnostic Laboratorial Immunology**, vol.7, p.828–831, 2000.

PEI, J.; TURSE, J.E.; FICHT, T.A. Evidence of *brucella abortus* ops dictating uptake and restricting NF-kb activation in murine macrophages. **Microbes and Infection**, vol.10, p.582-590, 2008.

PEI, J.; FICHT, T.A. Lipopolysaccharide: a complex role in the pathogenesis of brucellosis. **The Veterinary Journal**, vol.189, P. 5–6, 2011.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose – uma revisão sistematizada. **Medicina Interna** vol. 10, n. 2, 2003

PILO, C.; TEDDE, M.T.; ORRÙ, G.; ADDIS, G.; LICARDI, M. *Brucella suis* infection in domestic pigs in Sardinia, Italy. **Epidemiology Infection**, vol.143, p.2170-2177, 2015.

PLUMB, G.E.; OLSEN, S.C.; BUTTKE, D. Brucellosis: ‘One Health’ challenges and opportunities. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.271-278, 2013.

POESTER, F.P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.105-115, 2013.

POLETTO, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.34, n.2, p.595-598, 2004.

PORTE, F.; NAROENI, A.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; LIAUTARD, J-P. Role of the *brucella suis* lipopolysaccharide o antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. **Infection and Immunity**, vol.71, n.3. p. 1481–1490, 2003.

PRAUD, A.; GIMENEZ, O.; ZANELLA, G.; DUFOUR, B.; POZZI, N.; ANTRAS, V. et al. Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, vol.104, p. 94-100, 2012.

[Digite aqui]

QUANCE, C.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; STUBER, T.; BRIGNOLE, T.; DeBESS, E.E.; BOYD, L. et al. Identification of source of *Brucella suis* infection in human by using whole-genome sequencing, United States and Tonga. **Emerging Infectious Disease**, vol. 22, n.1, p.79-82, 2016.

RAGAN, V.; VROEGINDEWEY, G.; BABCOCK, V. International standards for brucellosis prevention and management. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.189-198, 2013.

RAJASEKARAN, P.; SURENDRAN, N.; SELEEM, M.N.; SRIRANGANATHAN, N. SCHURIG, G.G.; BOYLE, S.M. Over-expression of homologous antigens in a leucine auxotroph of *Brucella abortus* strain RB51 protects mice against a virulent *B. suis* challenge. **Vaccine**, vol. 29, p.3106–3110, 2011.

RAMAMOORTHY, S.; WOLDEMESKEL, M.; LIGETT, A.; SNIDER, R.; COBB, R.; RAJEEV, S. *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. **Emerging Infectious Disease**, vol. 12, n.2, p.2386-2387, 2011.

REFAI, M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p. 81-110, 2002.

RENUKARADYA, G.J; ISLOOR, S.; RAJASEKHAR, M. Epidemiologic, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. **Veterinary Microbiology**, vol. 90, p.183-195, 2002.

RHYAN, J.C; NOL, P.; QUANCE, C.; GERTONSON, A.; BELFRAGE, J.; HARRIS, L. ET al. Transmission of Brucellosis from Elk to Cattle and Bison, Greater Yellowstone Area, USA – 2002-2012. **Emerging Infectious Diseases**, vol.19, n.12, 2013

RIBEIRO, T.C.F.S.; MOTA, R.A.; COSTA, A.N.; LIMA, E.T.; JÚNIOR, I.F.C. Inquérito soropidemiológico da brucelose suína em granjas comerciais da zona da mata de Pernambuco. **Ciência Animal**, vol.11, n.2, p.65-71, 2001.

RIDOUTT, C; LEE, A; MOLONEY, B; MASSEY, P.D.; CHARMAN, N., JORDAN, D. Detection of brucellosis and leptospirosis in feral pigs in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, vol. 92, n.9, p.343-347, 2014.

RODRÍGUEZ, C.C.; HEREDIA, O. R.; FERNÁNDEZ, M.M.; GONZÁLEZ, G.G. Intervención educativa para elevar nivel de conocimiento sobre brucelosis em trabajadores expuesto a riesgo: municipio Camagüey. **Archivo Médico de Camagüey**, vol.13, n.3, 2009.

RODRÍGUEZ, M.C.; VIADAS, C.; SEOANE, A.; SANGARI, F.J.; LÓPEZ-GONI, I. et al. Evaluation of the Effects of Erythritol on Gene Expression in *Brucella abortus*. **PLoS ONE** vol. 7, n.12, e50876, 2012.

ROOP II, R.M.; JENNIFER, M.G.; ANDERSON, E.S.; CASWELL, C.C.; MARTIN, D.W. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. **Medicine Microbiology Immunology**, vol. 98, p.221–238, 2009.

ROSA, D.C.; GARCIA, K.C.O.D.; MEGID, J. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 32, n.7, p.623-626, 2012

ROSS, H.M.; JAHANS, K.L.; MacMILLAN, A.P.; REID, R.J.; THOMPSON, P.M.; FOSTER, G. *Brucella* species infection in North: sea seal and cetacean populations. **The Veterinary Record**, vol. 29, p.647-650, 1996.

[Digite aqui]

ROXO, E.; BERSANO, J.G.; PORTUGAL, M.A.S.C.K. *Brucella suis* em diversas espécies de animais numa mesma propriedade rural. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, vol. 63, n.1, p.11-14, 1996.

RUIZ, N.; KAHNE, D.; J. SILHAVY, T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. **Microbiology**, vol.4, p.57-67, 2006.

SAMARTINO, L.E. Brucellosis in Argentina. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p.71-80, 2002.

SANDFOSS, M.R.; DEPERNO, C.S.; BETSILL, C.W.; PALAMAR, M. B.; ERICKSON, G.; KENNEDY-STOSKOPF, S. A Serosurvey for *Brucella suis*, Classical Swine Fever Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Pseudorabies Virus in Feral Swine (*Sus scrofa*) of Eastern North Carolina. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 48, n.2, 2012, p.462–466, 2012.

SANZ, C. SÁEZ, J.L.; ÁLVAREZ, J.; CORTÉS, M.; PEREIRA, G. REYES, A. et al. Mass vaccination as a complementary tool in the control of a severe outbreak of bovine brucellosis due to *Brucella abortus* in Extremadura, Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 97, p. 119–125, 2010.

SCHELLING, E.; DIGUIMBAYE, C.; DAOUDC, S.; NICOLET, J.; BOERLIN, P, TANNER, M. et al. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. **Preventive Veterinary Medicine** vol. 61, p. 279–293, 2003

SELEEM, M., N., BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**, vol.129, p.1-14, 2008.

SELEEM, M., N., BOYLE, S.M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**. vol.140, p. 392–398, 2010.

SILVA, M.A.; SOUZA, L.C.A.; SANTANA, F.C.; VALENÇA, R.M.B; MOTA, R.A. Inquérito soropidemiológico da infecção por *brucella spp.* em granjas suínícolas tecnificadas no estado de Alagoas. **VI EPCC Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**. Anais...27 a 30 de outubro de 2009.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS SUÍNOS, **Manual de Procedimentos Sanitários para Suinocultura**, ed.3, 162p., Rio Grande do Sul, 2015.

SKENDROS, P.; BOURA, P. Immunity to brucellosis **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.,32, n.1, p.137-147, 2013.

SMITS, H.L. Brucellosis in pastoral and confined livestock: prevention and vaccination. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol. 32, n.1, p.219-228, 2013.

SPERA, J.M.; UGALDE, J.E.; MUCCI, J.; COMERCI, D.J.; UGALDE, R.A. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. **PNAS**, vol. 103, n.44, p.16514–16519, 2006.

STOFFREGEN, W.C.; OLSEN, S.C., WHEELER, C.J.; BRICKER, B.J.; PALMER, M.V.; JENSEN, A.E.; et al. Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. **International Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, vol.19, p.227–237, 2007.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; LONSWAY, D.R.; GRIBBLE, S. BELL, S.C.; JENNISON, A.V. et al. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BioMed Central Microbiology** vol. 10, p.10-23, 2010.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; TAYLOR, T.K.; SETUBAL, J.C.; HOFFMASTER, A.R. et al. Characterization of Novel *Brucella* Strains Originating from Wild Native Rodent Species in North Queensland, Australia. **Applied And Environmental Microbiology**, vol.76, n.17, p.5837–5845, 2010.

UGALDE, J.E; CZIBENER, C.; FELDMAN, M.F.; UGALDE, R.A. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. **Infection and immunity**, vol.68, n.10; p. 5716–5723, 2000.

UGALDE, J.E; COMERCI, D.J.; LEGUIZAMON, S.; UGALDE, R.A. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. **Infection and immunity**, vol.71, n.11; p. 6264-6269, 2003.

VALLAT, B. Brucellosis: recent developments towards "One Health". **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.9-11, 2013.

VAN AERT, A.; BRIOEN, P.; DEKEYSER, P.; UYTTERHAEGEN, L.; SIJENS, R. J; BOEY, A. A comparative study of elisa and other methods for the detection of *bucella* antibodies in bovine sera. **Veterinary Microbiology**, vol.10, p.13-21, 1985.

VARGAS, F. J. Brucellosis in Venezuela. **Veterinary Microbiology**, vol.90, p. 39-44, 2002.

VERGER, J.M.; GRAYON, T. L.; TIBOR, A.; WANSARD, V. Differentiation of *Brucella melitensis*, *B. ovi* and *B. suis* biovar 2 strains by use of membrane protein- or cytoplasmic protein-specific gene probes. **Research in. Microbiology**, vol.149, p. 509-517, 1998.

VESCHI, J. L. A.; LANDIM, A. M. de S.; RAMOS, E. M.; ZAFALON, L. F. Levantamento da brucelose em ovinos e caprinos da região do submédio do Vale do São Francisco, Pernambuco, Brasil. **Encontro Nacional de Epidemiologia Veterinária - ENEPI**, Suplemento 2. São Paulo, jul. 2012

WANKE, M.M. Canine brucellosis. **Animal Reproduction Science**, vol. 82–83, p.195–207, 2004.

WARD, D.E.; RUPPANNER, R.; MARCHOT, P.J.; HANSEN, J.W. One medicine—practical application for non sedentary pastoral populations. **Nomadic Peoples**, vol. 32, p.55–63, 1993.

WEINER, M.; SZULOWSKI, K.; IWANIAK, W. The value of Fluorescence Polarisation Assay in verification of problematic sera from pigs for brucellosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, vol.15, n.4, 801-802, 2012.

WELBURN, S. C.; BEANGE, I.; DUCROTOY; M. J.; OKELLO, A. L. The neglected zoonoses - the case for integrated control and advocacy. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 21 n.5, p.433-445, 2015.

WHATMORE, A.M.; PERRETT, L.L.; MacMILLAN, A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. **BioMed Central Microbiology**, vol.7, n.34, 2007.

WHATMORE, A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, vol.9, p.1168–1184, 2009.

WOOD, G.W.; HENDRICKS, J.B.; GOODMAN, D. E. Brucellosis in Feral Swine. **Journal of Wildlife Diseases**, vol.12, p.579-584, 1976.

WORLD ORGANIZATION ANIMAL HEALTH -O.I.E. Bovine brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p. 1–35, 2009

[Digite aqui]

WORLD ORGANIZATION ANIMAL HEALTH-O.I.E. Disponível em <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016>>. Acesso em: 20 ago 2016.

WYATT, H.V. Lessons from the history of brucellosis. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol. 32, n.1, p.17-25, 2013.

WYKOFF, A. C.; HENKE, S.; CAMPBELL, T.; HEWITT, DAVID.; VERCAUTEREN, KURT C. Preliminary Serologic Survey of Selected Diseases and Movements of Feral Swine in Texas. **Wildlife Damage Management Conferences -- Proceedings**. Paper 95, 2005.

XAVIER, N.M.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. The genus *Brucella* and clinical manifestation of brucellosis. **Ciência Rural**, vol.39, n.7, 2009.

ZAMMIT, T., A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever. **Reports of the Commission on Mediterranean Fever, part III, Harrison and Sons**, London, 1905, p. 83.

ZHELUDKOV, M.M.; TSIRELSON, L.E. Reservoirs of *Brucella* Infection in Nature. **Biology Bulletin**, vol.37, n.7, p.53-60, 2010.

ZHONG, Z.; YU, S.; WANG, X., DONG, S.; XU, J.; WANG, Y et al. Human brucellosis in the People's Republic of China during 2005–2010. **International Journal of Infectious Diseases**, vol.17 e289–e292, 2013.

ZHU, L.; FENG, Y.; ZHANG, G.E.; JIANG, H.; ZHANG, Z.; WANG, N. et al. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections. **Vaccine**, vol.34, p.395–400, 2016.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; WYSS, K.; MAHAMAT, M. B. Potential of cooperation between human and animal health to strengthen health systems. *Lancet*, vol. 366, p.2142–2145, 2005.

ZINSSTAG, J.; SCHELLING, E.; ROTH, F.; BONFOH, B.; SAVIGNY, D.; TANNER, M. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. **Emerging Infectious Diseases**, vol.13, n.4, 2007.

ZYGMUNT, M.S.; BLASCO, J.M.; LETESSON, J-J.; CLOECKAERT, A.; MORIYÓN, I. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. **BioMed Central Microbiology**, vol. 9, p.92- 105, 2009.

## CAPÍTULO II

Este capítulo descreve o experimento executado no formato de artigo científico.

### ARTIGO CIENTÍFICO

**TÍTULO: Soroprevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal, Brasil.**

#### SUMÁRIO

Baixa ocorrência de anticorpos contra *Brucella* em criatórios de suínos no Distrito Federal sugere bons desempenhos alcançados pelo sistema de vigilância de defesa agropecuária exercido pelo serviço veterinário oficial da Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural do DF.

**Autores:** Luciana L. Rigueira<sup>1</sup>, Paulo Martins Soares<sup>2</sup>, Patricia Gomes de Souza<sup>2</sup>, Luciana F. L. S. Vilanova<sup>3</sup>, Simone Perecmanis<sup>4</sup>

#### Filiação dos autores:

<sup>1</sup>Médica Veterinária, mestranda da Universidade de Brasília – UnB.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Msc, Laboratório Nacional de Agropecuária, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Médica Veterinária, Msc. Programa Pós graduação de Saúde Animal da UnB

<sup>4</sup>Médica Veterinária, professora da Universidade de Brasília – UnB e diretora da Faculdade de Agronomia e Veterinária – FAV.

**Endereço para correspondência:** Simone Perecmanis, Faculdade de Agronomia e Veterinária – FAV, Darcy Ribeiro *Campus*. Universidade de Brasília Asa Norte Brasília – DF, Cep: 70.910-970 Tel.: 55 61 3107-7122 FAX: 55 61 3107-7118 E-mail: [perecmaniss@unb.br](mailto:perecmaniss@unb.br)

## RESUMO

Brucelose é uma doença responsável por prejuízos econômicos em rebanhos domésticos, apresenta potencial zoonótico e sua notificação é obrigatória. O programa de controle e erradicação da brucelose no Brasil respalda-se em medidas aplicadas a rebanhos bovinos e o controle em suínos é direcionado a rebanhos comerciais, entretanto suínos de subsistência podem ser reservatórios. Inquéritos epidemiológicos direcionados a esta população podem contribuir para analisar a efetividade do programa de controle e erradicação da doença. Nesse sentido, sugere-se que a vigilância deve ser focada na situação real de uma determinada região, a qual permite avaliar a efetividade do programa de controle nacional. Portanto, esse estudo teve como objetivo a avaliação sorológica para brucelose suína em 823 criatórios no Distrito Federal. Amostras de soro de 1793 suínos foram congeladas após a conclusão do inquérito epidemiológico para Peste Suína Clássica (PSC) realizado entre junho a outubro de 2011, 2012 e 2014, delineado pelo Ministério da Agricultura. Para a identificação de anticorpos contra a cepa lisa de *Brucella*, o teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) foi adotado como teste de triagem e as amostras reagentes foram enviadas para o Laboratório Nacional Agropecuário de Pedro Leopoldo, LANAGRO – MG para a confirmação de possíveis resultados positivos pela técnica Soroaglutinação lenta em tubos (SAT) e 2-Mercapto-etanol (2-ME). As amostras de soro reagentes no teste AAT também foram semeados em ágar sangue e incubadas em atmosfera microaerofílica por 24 horas com o intuito de verificar crescimento microbiano. Os dados foram tabulados no software STATA® para o cálculo da prevalência. Apenas uma amostra (1/1793), foi confirmada no teste 2-ME. A prevalência da brucelose suína a partir das amostras do estudo de 2011 foi 0,47% (IC 95%; 0,01 – 2,62). Não houve confirmação de suínos positivos para brucelose nas amostras coletadas em 2012 e 2014. Esta pesquisa sugere que a brucelose suína não representa um problema sanitário no DF e que as medidas sanitárias inclusas no controle da brucelose em bovinos associadas às medidas preventivas estabelecidas na suinocultura comercial são fundamentais para manter níveis de ocorrência da doença em patamares baixos.

**Palavras Chaves:** *Brucella sp.*, suínos de subsistência, vigilância agropecuária, Distrito Federal.

## INTRODUÇÃO

A infecção causada pela *Brucella sp.* pode envolver animais domésticos e silvestres (Nymo *et al.*, 2013), aquáticos e terrestres (Nymo *et al.*, 2011). A doença provoca prejuízos econômicos, principalmente pela queda na eficiência reprodutiva (Czibener *et al.*, 2016). A doença é de notificação obrigatória pelos países membros da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2016) apresenta reflexo no comércio internacional (Vallat, 2013) e impacto na saúde pública (Ragan *et al.*, 2013).

A brucelose é uma das zoonoses mais disseminadas no mundo (Welburn *et al.*, 2015) e seu controle deve ser direcionado em animais por meio de programas sanitários (Godfroid, 2013). Em países endêmicos, a prioridade é erradicar a doença em propriedades rurais (Czibener *et al.*, 2016). Entretanto, mesmo em países que já alcançaram o status livre da brucelose, medidas preventivas são necessárias. Na Europa (Kreizinger *et al.*, 2014) e nos EUA (Leiser *et al.*, 2013) suínos asselvajados e outros animais silvestres (Rhyan *et al.*, 2013) são monitorados por meio de inquéritos epidemiológicos e ações de vigilância.

*Brucella melitensis* é a espécie mais virulenta (Blasco & Molina-Flores, 2011), sendo exótica no Brasil (OIE, 2016). *Brucella abortus* é a espécie que circula com maior prevalência no território nacional (Poester *et al.*, 2013), seguida da *Brucella suis* em suínos (Poester *et al.*, 2002). *Brucella suis*, a segunda espécie mais patogênica, foi isolada em uma propriedade rural do estado de São Paulo responsável por causar infecções cruzadas em espécies que eram criadas no mesmo ambiente, como também nos tratadores (Roxo *et al.*, 1996).

No Brasil existem programas sanitários para o controle da brucelose. O Programa Nacional de Controle e Erradicação da brucelose - PNCBET é direcionado apenas para a espécie bovina (Brasil, 2006). O Programa de Sanidade Suídea - PNSS inclui medidas preventivas para o controle das principais doenças que acometem rebanhos suínos comerciais, entretanto, suínos de subsistência podem ser reservatórios e disseminar a doença (Brasil, 2002).

Dados do último inquérito nacional estimou a prevalência da brucelose em suínos no país em 0,34% (Brazil, 2000). Em outro estudo da brucelose em suínos no Brasil, (Mota *et al.*, 2010) não se identificou amostras positivas pela prova confirmatória 2-ME. Por outro lado, pesquisas regionais estimam ocorrências maiores da brucelose em suínos em Goiás (Matos *et al.*, 2004; Barthasson, 2005); Rio de Janeiro (Jesus *et al.*, 2010); São Paulo (Rosa *et al.*,

[Digite aqui]

2012); Rio Grande do Norte (Leite *et al.*, 2014) e apresentam dados nasográficos que podem contribuir para analisar a efetividade do programa de controle e erradicação da doença.

Portanto, este trabalho objetivou estimar a prevalência da brucelose em criatórios de suínos no Distrito Federal e dessa forma, contribuir para aumentar a sensibilidade do sistema de vigilância ativa da defesa agropecuária do DF.

## **MATERIAIS e METÓDO**

### **Amostragem**

Utilizaram-se amostras de soro de suíno colhidas em duplicata durante os inquéritos epidemiológicos delineados pelo Ministério da Agricultura - MAPA para Peste Suína Clássica em 2011, 2012 e 2014 em criatórios de subsistência. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos para separação do soro e descarte do coágulo e estocadas a -18°C até o momento da análise.

O uso das amostras foi autorizado pelo MAPA e SEAGRI-DF e as análises realizadas em julho de 2015 para as amostras de 2014 e em maio de 2016 para as amostras de 2011 e 2012. Cada amostra representou um suíno de subsistência identificado por sexo e idade. Todos proprietários relataram que os animais nasceram nos respectivos criatórios. Os criatórios foram georreferenciados e a distribuição dessas propriedades foram plotadas em figuras de mapas.

### **Cálculo do tamanho da amostra**

O cálculo do tamanho da amostra foi obtido com o auxílio do programa Epitool® (Seargeant, 2009), considerando o número de criatórios cadastrados na SEAGRI-DF na época de cada estudo, nível de confiança de 95%, precisão de 1,5% e prevalência de 2%, conforme a fórmula:

$$n = \frac{z^2 \times p \times (1 - p)}{d^2}$$

Onde n é o tamanho da amostra, z é 1,96 (valor da distribuição normal padrão correspondente ao nível de confiança 95%), p é a prevalência esperada e d é a precisão desejada, isto é, a margem de erro estimada.

A amostragem de animais dentro dos criatórios visou obter 95% de probabilidade de detecção de pelo menos um suíno soropositivo, com a finalidade de classificar o criatório

[Digite aqui]

como infectado ou não infectado. A amostragem restringiu-se aos animais adultos e na maioria das propriedades sorteadas todos os animais foram testados para o alcance de uma sensibilidade de rebanho de no mínimo de 95%.

A seleção dos criatórios participantes da pesquisa foi aleatória com base no cadastro dessa tipologia produtiva da SEAGRI- DF. A prevalência estimada para o cálculo do tamanho da amostra considerou a baixa prevalência da brucelose suína em estudos nacionais anteriores (Brasil, 2000; Mota et al., 2010).

### **Testes Diagnósticos**

Para a detecção da brucelose em suínos aplicou-se a técnica Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de triagem e as amostras reagentes foram confirmadas pelos testes Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAT) e 2- Mercapto Etanol (2-ME), em série. A frequência da prevalência foi calculada pela leitura comparada dos resultados de diluição dos testes SAT e 2-ME. Os protocolos adotados seguiram as normas descritas no Manual Diagnóstico de Testes e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2009). As amostras de soro reagentes no teste AAT também foram semeadas em ágar sangue e incubados em atmosfera microaerofílica por 24 horas com o intuito de verificar crescimento microbiano.

### **Análise estatística e aspectos éticos**

A prevalência da brucelose suína em propriedades rurais de subsistência foi calculada com o auxílio do programa STATA® (Statacorp, 2011) considerando intervalo de confiança de 95%. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, conforme protocolo 66698/2016.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os criatórios estão localizados em 84 localidades rurais de 16 regiões administrativas representadas por Brazlândia, Ceilândia, Cidade Estrutural, Fercal, Gama, Itapoã, Núcleo Bandeirante, Paranoá, Planaltina, Recanto das Emas, Riacho Fundo, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Sobradinho e Taguatinga (Figura 2, Figura 3 e Figura 4).

A população suína, representada por 565 criatórios em 2011; 865 em 2014 e 1.665 em 2014, foram aleatoriamente selecionadas totalizando 823 criatórios distintos e 1793 suínos acima de 8 meses de idade (Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de criatórios e de suínos adultos por ano

Ano	Criatórios	Suínos
2011	210	542
2012	293	581
2014	320	670
Total	823	1793

Apenas uma das 1793 amostras testadas selecionada no estudo de 2011 foi confirmada como positiva. A partir das amostras selecionadas, a prevalência da brucelose estimada em 2011 foi 0,47% (IC 95%; 0,1 – 2,62). Em 2012 e 2014, apesar de não haver resultados positivos, é possível afirmar com 97,5% de confiança, que caso a doença ainda esteja presente no rebanho suíno do DF, a prevalência seria inferior a 1,2 % (Tabela 2).

**Tabela 2:** Prevalência da brucelose em criatórios suínos por ano de estudo

Ano	Positivos	Prevalência	Intervalo de Confiança
2011	1	0,47	95% (0 – 2,6%)
2012	0	0	97,5%(0 – 1,251%)
2014	0	0	97,5%(0 – 1,146%)

A prevalência estimada da brucelose suína no DF foi inferior aos índices encontrados nas regiões nordeste e sudeste (Ribeiro et al., 2001; Leite et al., 2014; Jesus et al, 2010; Rosa et al., 2012). Entretanto, os resultados desse trabalho corroboram com o último inquérito nacional em rebanhos suínos (Brasil, 2000) e com estudos realizados no Piauí (Braga et al., 2013) e em Rondônia (Aguilar et al., 2006), cuja prevalências da brucelose suína estimada foi 1,04% e 0,9%.

Entre as 125 amostras reagentes no AAT, 45 foram positivas no SAT e somente uma no 2-ME. O teste de triagem selecionado apontou resultados falso positivos, uma vez que 15% dos 823 criatórios obtiveram pelo menos um animal reativo no AAT.

Observou-se que 40% de amostras reagentes eram oriundas de soros com presença de hemólise e este pode ter sido um fator relacionado aos resultados falsos positivos, conforme caracterização de possível artefato descrito na bula do protocolo AAT.

A técnica AAT é recomendada como triagem para rebanhos suínos (Muñoz et al., 2012) e amplamente utilizada na rotina de programas sanitários (Brasil, 2002), por apresentar maior sensibilidade que o SAT (Ribeiro et al., 2001; Nielsen, 2002), mas com correções de pH no meio dissolvido com o corante Rosa Bengala que reduziria resultados falso positivos.

Embora o meio acidificado da técnica AAT (pH 3,65) favoreça a inibição de aglutinações por IgM, reações inespecíficas ainda podem estar presentes. Possíveis explicações para o elevado número de reagentes podem ser devido a reações cruzadas com *Yersinia enterocolitica* O:9 (Nielsen et al., 2006) e outras Gram-negativas (Allen et al, 1998; Nymo et al, 2013).

Dessa forma, é recomendável associar SAT e 2-ME para resultados mais confiáveis (Brasil, 2006), pois o reagente redutor 2-mercaptoetanol é responsável por quebrar as cadeias dissulfeto presentes nas IgM e apenas aglutinações mediadas por IgG resistem (Nielsen, 2002).

Outra possível explicação para os resultados falso positivos seria eventuais contaminações na amostra durante a coleta. Houve crescimento em 38% das placas semeadas a partir das amostras reagentes no AAT, em sua maioria foi possível identificá-las como Gram-negativas no microscópio óptico, mas também foram isoladas bactérias hemolíticas e Gram-positivas.

O PNCEBT é o programa nacional da brucelose cuja estratégia adotada visa a redução da prevalência da brucelose por meio da vacinação de fêmeas bovinas de 3 a 8 meses de idade e abate sanitário de positivos (Brasil, 2006). O Programa Nacional de Sanidade Suídea – PNSS preconiza realização de testes a cada seis meses para inúmeras doenças, inclusive brucelose, em granjas de reprodutores, os quais irão compor rebanhos comerciais (Brasil, 2002).

Ações preventivas no intuito de evitar fatores de risco como o trânsito indiscriminado (Matos et al., 2014), a criação de múltiplas espécies (Roxo et al., 1996) ou adoção de fatores de proteção como separação no momento do parto (Ning et al., 2013) e controle do sêmen resfriado em granjas que adotam a inseminação artificial (Bianchi et al., 2006) são relevantes no controle da doença. Além disso, a biossegurança, a inspeção veterinária durante o abate *ante mortem* e *post mortem* e a programação de exames laboratoriais em reprodutores de descarte são essenciais no controle da doença e na segurança alimentar.

Em decorrência do resultado positivo de um criatório de suíno no Distrito Federal e como requisito do serviço veterinário oficial, planejou-se o retorno ao criatório de origem da

[Digite aqui]

amostra positiva com fins de investigação de uma possível manutenção da circulação do agente patogênico.

Os cinco suínos existentes na propriedade foram testados pela técnica AAT e uma amostra de um suíno não castrado de 8 meses foi reagente. Com o intuito de isolar o microorganismo, coletou-se swab de prepúcio do suíno positivo de 8 meses e swab da vagina da fêmea reprodutora do plantel. Em seguida, a amostra foi semeada em placa e incubada em atmosfera microaerofílica. A leitura da lâmina pelo método Gram evidenciou crescimento de colônias Gram-positivas e testes bioquímicos confirmaram crescimento bacteriano de *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. Embora não tenha sido possível confirmar a amostra reagente em 2016, a possibilidade do patógeno permanecer naquele criatório não pode ser descartada.

O animal positivo pertencia a um criatório no qual o produtor tinha o hábito de fornecer soro de leite bovino para a alimentação de suínos. A SEAGRI-DF foi notificada em 2011 por sete focos da brucelose no DF, sendo três deles próximo à Estrutural. A investigação epidemiológica sugere que a origem da contaminação dos suínos pode ter sido por contaminação de *Brucella abortus* via alimentação, entretanto, uma análise mais minuciosa requer a caracterização da espécie da brucela, uma vez que direcionaria a controle de fatores de riscos específicos envolvidos na transmissão da doença e na elaboração de estratégias preventivas.

## CONCLUSÃO

A brucelose circula em baixos níveis em rebanhos suínos no Distrito Federal. As medidas preventivas inclusas no programa nacional de controle da brucelose bovina e no programa nacional de sanidade suína foram fundamentais para manter o baixo nível de ocorrência da doença. Apesar do programa nacional da brucelose– PNCEBT não incluir ações específicas para criatórios de suínos, o PNCBET contribui para a não propagação da *Brucella abortus* em suínos, uma vez que reduz a probabilidade de infecções cruzadas.

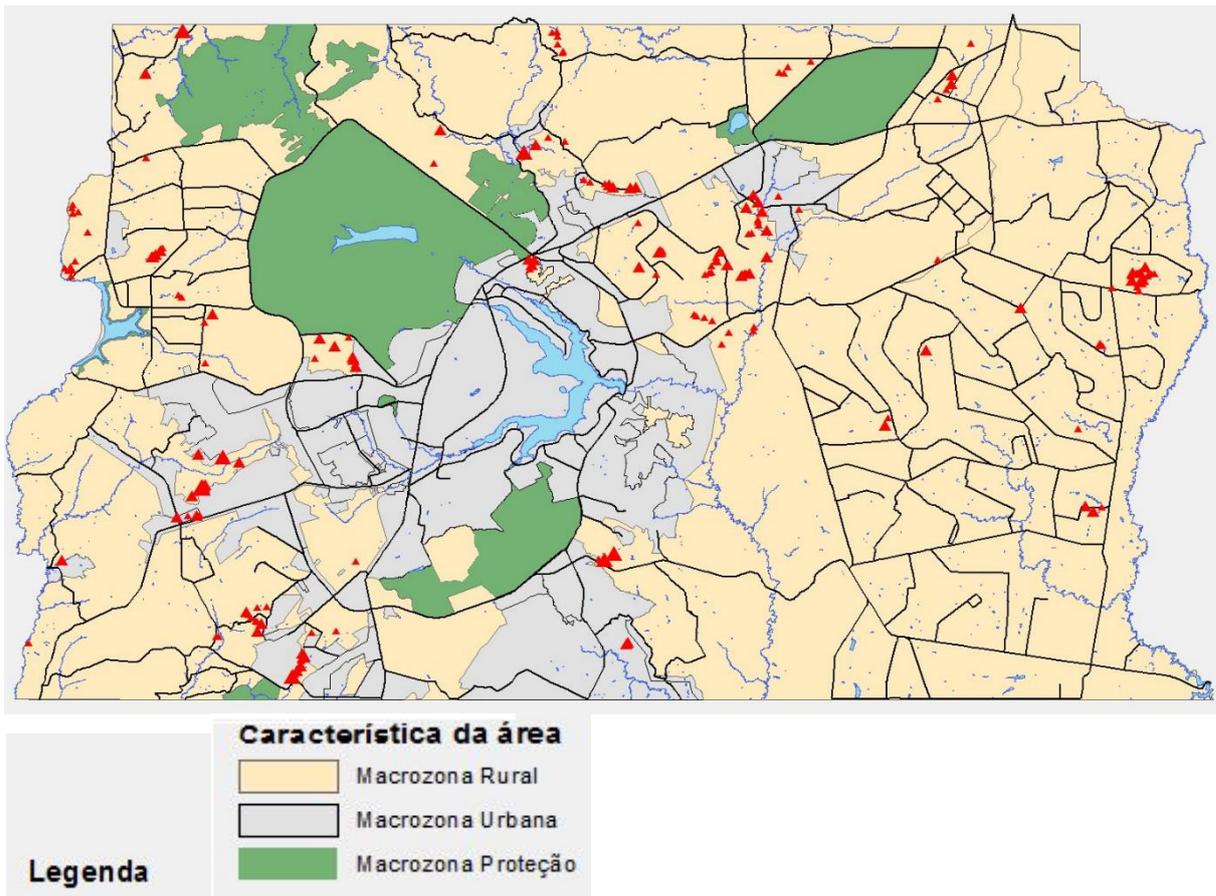
Contudo, ainda há necessidade de reforçar orientações sobre a doença em atividades de educação sanitária e coibir práticas que favoreçam a manutenção do patógeno em rebanhos. Acredita-se que para incrementar o sistema de vigilância agropecuária do DF deve-se incluir investigação epidemiológica para ocorrência de abortamentos ou redução do tamanho da leitegada durante as visitas de vigilância ativa em propriedades de risco para peste suína clássica e adaptar o formulário de colheita de sangue para o monitoramento sorológico

[Digite aqui]

para peste suína clássica com o intuito de incluir no questionário se há fornecimento de soro de leite bovino para alimentação de suínos.

Futuros estudos que incluam a caracterização da espécie de brucela podem ser incentivados com objetivo de aprofundar a investigação epidemiológica e direcionar medidas preventivas e de erradicação da brucelose suína.

## FIGURAS



**FIGURA 2** Criatórios de suínos amostrados no estudo de 2011



## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; DIB C.C.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA E.M.S.; LARA, M.C.C.S.H.; et al. Anticorpos contra agentes bacterianos e virais em suínos de agricultura familiar do município de monte negro, RO. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol.73, n.4, p.415-419, 2006.
- ALLEN, C.A.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. Transposon-derived *brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival **Infection and Immunity**, vol.66, n.3, p.1008–1016, 1998.
- AMARAL, L.A.; ROSSI, O.D.; NADER FILHO, A.JR.; DE SOUZA, M.C.I; ISA, H. Risco à saúde humana e animal. **ARS Veterinária**, vol. 21, n.1, p.41-46, 2005.
- BIANCHI, I.; SCHAAF, S.; CORRÊA, E.K; PERONDI, A.; LUCIA, T. JR.; DECHAMPS, J.C. et al. Importância do uso da inseminação artificial na prevenção da veiculação de patógenos através do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 30, n.1/2, p.72-77, 2006.
- BRAGA, J.F.V.; TEIXEIRA, M.P.F.; FRANKLIN, F.L.A.A.; SOUZA, J.A.T.; SILVA, S.M.M.S.; GUEDES. R.M.C. Soroprevalência de pseudorraiva, peste suína clássica e brucelose em suínos do estado do Piauí. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 65, n.5, p. 1321-1328, 2013.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, vol.30, p.39–50, 2000.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA Nº 19 DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2006.
- CZIBENER, C.; DEL GIUDICE, M. G.; SPERA, J. M.; FULGENZI, F. R.; UGALDE, J. E. Delta-gpm, a new live-attenuated vaccine against *Brucella suis*. **Vaccine**, vol. 34, p.1524–1530, 2016.
- DIESTE-PÉREZ, L.; BLASCO, J.M.; DE MIGUEL, M.J.; MORIYÓN, I.; MUÑOZ, P.M; Diagnostic performance of serological tests for swine brucellosis in the presence of false positive serological reactions. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 111, p. 57–63, 2015.
- GANESH, N.V.; SADOWSKA, J.M.; SARKAR, S.; HOWELLS, L. McGIVEN, J.; BUNDLE, D.R. Molecular Recognition of *Brucella* A and M Antigens Dissected by Synthetic Oligosaccharide Glycoconjugates Leads to a Disaccharide Diagnostic for Brucellosis. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 136, p.16260–16269, 2014.
- GODFROID, J.; AL DAHOUK, S.; PAPPAS, G.; ROTHF, F. MATOPE, G.; MUMAH, J. et al. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: Moving away from improvisation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** vol.36, p.241-248, 2013
- JESUS, V.L.T.; PEREIRA, R.C.G.; MEIRELES, G.S.; RODRIGUES, J.L.; JORGE, J.L.B.P; FLAUSINO; W. Brucelose suína no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, vol. 32, n.2, p.101-104, 2010.

KREIZINGER, Z.; FOSTER, J.T.; B, RONAI, Z.; SULTYOK, K. M.; WEHMANN, E.; JÁNOSI S.; GYURANECZ, M. Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. **Veterinary Microbiology**, vol.172 p. 492-498, 2014.

KUNDA, J.; FITZPATRICK, J.; KAZWALA, R.; FRENCH, N.P.; SHIRIMA, G.; MacMILLAN, A. Health-seeking behaviour of human brucellosis cases in rural Tanzania. **BioMed Central Public Health**, vol.7, p. 315-322, 2007.

LEISER, O.P.; CORN, J. L., SCHMIT, B.S.; KEIM, P.S.; FOSTER, J.T. Feral swine brucellosis in the United States and prospective genomic techniques for disease epidemiology. **Veterinary Microbiology**, vol.166, p. 1-10, 2013.

LEITE, R.M.H.; THOMPSON, J.A.; GONÇALVES, V.S.P.; LEITE, R.C.; BANDEIRA, D.A.; LAGE, A.P. A random sample survey of bovine brucellosis in the state of paraíba, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol.40, p.170-174, 2003.

LEITE, A.I.; COELHO, W.A.C.; SILVA, G.C.P.; SANTOS, R.F.; MATHIAS, L.A. DUTRA, I.S. Prevalência e fatores de risco para brucelose suína em Mossoró-RN. **Pesquisa veterinária brasileira**, vol. 34 n.6, p. 537-541, 2014

MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J.; PÔRTO, R.N.G.; MEIRINHOS. M.L.G. Ocorrência de anticorpos para *brucella sp.* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia, estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** vol. 5, n.2, p.105-108, 2004.

MOTA, P.M.C.; JR FONSECA, A.A.; OLIVEIRA, A.M.; NASCIMENTO, K.F.; FILHO SOARES, P.M. Inquérito soropidemiológico para brucelose em suínos do Brasil. **Veterinária em Foco**, vol.7, n.2, p.141-147, 2010

MUÑOZ, P.M.; BLASCO, J.M.; ENGEL, B.; MIGUEL, M.J.; MARÍNA, C.M.; DIESTE, L.; et al. Assessment of performance of selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol.146, p.150– 158, 2012.

NIELSEN, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, vol.9, p.447-459, 2002.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; YU, W.; NICOLETTI, P.; JUNGENSEN, G.; STACK, J.; et al. Serological discrimination by indirect enzyme immunoassay between the antibody response to *Brucella sp.* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 in cattle and pigs. **Veterinary Immunopathology**, vol.109, p.69-78, 2006.

NING, P.; GUO, M.; GUO, K.; XU, L.; REN, M.; et al. Identification and Effect Decomposition of Risk Factors for *Brucella* Contamination of Raw Whole Milk in China. **PLoS ONE**, vol.8, n.7, e68230, 2013.

NYMO, I.H.; GODFROID, J.; ÅSBAKK, K.; ANETT, K.L.; TRYLAND, M.; NEVES, C.G.; et al. A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Brucella* antibodies in Arctic wildlife. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, vol. 25, n.3, p.369–375, 2013.

PAPPAS, G. The changing brucella ecology: novel reservoirs, new threats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 36, p. s8–s11, 2010.

PRAUD, A.; GIMENEZ, O.; ZANELLA, G.; DUFOUR, B.; POZZI, N.; ANTRAS, V. et al. Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. **Preventive Veterinary Medicine**, vol.104, p. 94-100, 2012.

[Digite aqui]

RAGAN, V.; VROEGINDEWEY, G.; BABCOCK, V. International standards for brucellosis prevention and management. **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.189-198, 2013

RHYAN, J.C; NOL, P.; QUANCE, C.; GERTONSON, A.; BELFRAGE, J.; HARRIS, L. ET al. Transmission of Brucellosis from Elk to Cattle and Bison, Greater Yellowstone Area, USA – 2002-2012. **Emerging Infectious Diseases**, vol.19, n.12, 2013.

RIBEIRO, T.C.F.S.; MOTA, R.A.; COSTA, A.N.; LIMA, E.T.; JÚNIOR, I.F.C. Inquérito soropidemiológico da brucelose suína em granjas comerciais da zona da mata de Pernambuco. **Ciência Animal**, vol.11, n.2, p.65-71, 2001.

ROSA, D.C.; GARCIA, K.C.O.D.; MEGID, J. Soropositividade para brucelose em suínos em abatedouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 32, n.7, p.623-626, 2012

ROXO, E.; BERSANO, J.G.; PORTUGAL, M.A.S.C.K. *Brucella suis* em diversas espécies de animais numa mesma propriedade rural. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo**, vol. 63, n.1, p.11-14, 1996

STATACORP. 2011. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP.

SEARGEANT, ESG, 2009. **Epitools epidemiological calculators**. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Disponível em: .

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; LONSWAY, D.R.; GRIBBLE, S. BELL, S.C.; JENNISON, A.V. et al. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. **BioMed Central Microbiology** vol. 10, p.10-23, 2010.

TILLER, R.V.; GEE, J.E.; FRACE, M.A.; TAYLOR, T.K.; SETUBAL, J.C.; HOFFMASTER, A.R. et al. Characterization of Novel *Brucella* Strains Originating from Wild Native Rodent Species in North Queensland, Australia. **Applied And Environmental Microbiology**, vol.76, n.17, p.5837–5845, 2010.

VALLAT, B. Brucellosis: recent developments towards "One Health". **Review Science Techniques of Office International Epizootias**, vol.32, n.1, p.9-11, 2013.

WORLD ORGANIZATION ANIMAL HEALTH -O.I.E. Bovine brucellosis. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p. 1–35, 2009

WORLD ORGANIZATION ANIMAL HEALTH-O.I.E. Available in <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016>>. Access: Aug. 20<sup>th</sup>, 2016.

## ANEXOS

### A - Protocolo AAT

#### Tarefa

Testar amostras de soro sanguíneo com o antígeno em suspensão de *Brucella abortus* cepa 119-3 em concentração de 8% em tampão pH 3,65 +/- 0,05 corada com Rosa Bengala com o intuito de identificar anticorpos anti-brucela.

#### Local de execução

Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária e seus setores de Bacteriologia e Micologia;  
Laboratório Multiuso.

#### Executante

Professores, técnicos, residentes, estudantes de pós-graduação, estagiários, monitores.

#### Resultados esperados

REAGENTE (presença de grumos) ou NÃO REAGENTE (ausência de grumos).

#### Material necessário

1. Jaleco;
2. Luvas;
3. Álcool 70%;
4. Bancada;
5. Estante para eppendorfs;
6. Vortéx;
7. Pipeta automática aferida para 30 uL;
8. Ponteiras estéreis;
9. Becker para descarte das ponteiras ou fenol descarte;
10. Misturados descartável – (pázinha de café);

11. Placa de vidro;
12. Caixa de luz;
13. Cronômetro;
14. Caneta permanente e lápis;
15. Ata para registro de resultados.

### Atividades

- Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura do laboratório por 30 a 45 minutos.
- Identificar a sequência utilizada na estante e na placa de vidro para a posterior correlação dos resultados.
- Homogeneizar rapidamente no vortéx o frasco com controle positivo e dispensar 30 uL no primeiro quadrante da placa de vidro com o auxílio de uma pipeta em ângulo de 45° para evitar a formação de bolhas de ar.
- Trocando a ponteira e adotando o mesmo procedimento, dispensar 30 uL do controle negativo no segundo quadrante.
- Na sequência de até 20 amostras de soro sanguíneo, para evitar ressecamento, homogeneizar os eppendorf no vortéx, abri-los com distância segura do operante e dispensar 30 uL em áreas individuais da placa de vidro, utilizando uma ponteira por amostra de soro.
- Agitar suavemente o frasco com o antígeno Rosa Bengala e dispensar 30 uL de antígeno nos vinte e dois quadrados delimitados na placa de vidro.
- Misturar com o misturador descartável - a pazinha de café – as gotas equivalentes de soro e antígeno com movimentos circulares de modo a obter um círculo aproximado de 2 cm. Trocar o misturador descartável e realizar o mesmo movimento circular nos quadrantes seguintes.
- Agitar a placa com movimentos oscilatórios, numa frequência, de aproximadamente, 30 movimentos por minuto, de modo a permitir que a mistura soro controle positivo-antígeno fluam lentamente dentro de cada círculo. A placa deve ser agitada continuamente por 4 minutos.
- Levar a placa na caixa de leitura com luz indireta para a leitura dos resultados.
- Anotar os resultados em livro ata.
- Desconsiderar as reações de aglutinação que ocorrerem após os 4 minutos.
- Lavar a placa de vidro com água corrente e detergente neutro.

### **Cuidados especiais**

- Antes que o processo seja iniciado é necessário esterilizar ponteiros suficientes, passar álcool 70% na bancada, lavar com água e detergente neutro a placa de vidro;
- Em todos os testes devem ser simultaneamente testados soros controle positivo e negativo;
- Fracionar o antígeno em alíquotas e retirar da geladeira apenas a quantidade a ser utilizada a cada dia, evitando assim a perda de sensibilidade pelo constante resfriamento/aquecimento do antígeno;
- Não se deve trabalhar com número grande de amostras para evitar evaporação, especialmente em ambientes quentes e secos;
- A placa de vidro deve ser limpa com água corrente logo após o uso e, preferencialmente, imergir as placas em solução de detergente por duas horas ou durante à noite. Em seguida, lavá-las em água corrente e, na sequência, em água destilada. Secar em estufa ou à temperatura ambiente.
- 

### **Ações em caso de não conformidade**

Repetir o teste de acordo com os procedimentos descritos acima.

### **Bibliografia utilizada**

- TECPAR– Instituto de tecnologia do Paraná. Antígeno soroaglutinação rápida para diagnóstico indireto da brucelose bovina. Suspensão de *Brucella abortus* cepa 119-3 em concentração de 8% em tampão pH 3,65 +/- 0,05 corada com Rosa Bengala. Responsável Técnico: Médico Veterinário R. C. Oliveira, CRMV-PR nº5362. Bula.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2006.

## B - Protocolo SAL/2-ME

### Tarefa

Testar amostras de soro sanguíneo por meio da técnica Soroaglutinação lenta em tubos e redução pelo 2 Mercapto-Etanol para o diagnóstico indireto da brucelose causada por espécies lisas de brucela (*B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*).

### Local de execução

Laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura (MAPA) ou o laboratório oficial LANAGRO, Pedro Leopoldo - MG.

### Executantes

Servidores do serviço veterinário oficial designados e previamente treinados ou profissionais habilitados e autorizados pelo MAPA.

### Resultados esperados

- O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo, incompleto ou negativo;
- Reação completa é aquela que o líquido da mistura soro-antígeno aparece transparente e límpido e uma agitação suave do tubo não rompe a aglutinação;
- Reação incompleta é aquela que o líquido da mistura soro-antígeno aparece turvo e uma agitação suave do tubo não rompe a aglutinação;
- Reação negativa é aquela que o líquido da mistura soro-antígeno aparece turvo e uma agitação suave do tubo não revela a aglutinação;
- Os resultados são expressados na forma de título.
- O título será a maior reação onde ocorreu uma reação positiva (completa ou incompleta) sendo o título da prova de SAL independente daquele encontrado na prova de redução do 2 ME, em um mesmo soro;

- A interpretação é baseada na turbidez da suspensão e na firmeza da aglutinação formada, após agitação suave dos tubos, conforme tabelas abaixo:

Tabela 1: Interpretação da prova 2ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses e vacinadas entre 3 e 8 meses de idade.

SAL \ 2ME	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	NEG								
25 I	NEG	NEG							
25	NEG	NEG	POS						
50 I	NEG	NEG	POS	POS					
50	NEG	NEG	POS	POS	POS				
100 I	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS			
100	Inc	Inc	POS	POS	POS	POS	POS		
200 I	Inc	Inc	POS	POS	POS	POS	POS	POS	
200	Inc	Inc	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

NR – NÃO REAGENTE I – REAÇÃO INCOMPLETA Inc – INCONCLUSIVO POS – POSITIVO

RESULTADO NÃO ESPERADO DE ACORDO COM OS PRINCÍPIOS DO TESTE

Tabela 2: Interpretação da prova 2ME para fêmeas não vacinadas e machos acima de 8 meses

SAL \ 2ME	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100
NR	NEG						
25 I	NEG	NEG					
25	NEG	NEG	POS				
50 I	NEG	NEG	POS	POS			
50	Inc	Inc	POS	POS	POS		
100 I	Inc	Inc	POS	POS	POS	POS	
100	Inc	Inc	POS	POS	POS	POS	POS

## Material necessário

1. Amostra de soro a serem testadas;
2. Antígeno prova lenta;
3. Soro controle reagente em SAL e 2ME com título conhecido (médio ou superior);
4. Soro controle não reagente;
5. Salina 0,85%;
6. Salina 0,85% fenicada 0,5%;
7. 2-Mercapto etanol;
8. Caixa com luz indireta para leitura;
9. Dispensadores automáticos de 1 mL e 2 mL;
10. Pipetas graduadas de 10 mL;
11. Micropipetas com volumes variados de 10  $\mu$ L a 100  $\mu$ L;
12. Ponteiras estéreis para micropipetas de 10  $\mu$ L a 100  $\mu$ L;
13. Tubos de vidro;
14. Balão volumétrico;
15. Erlenmeyer;
16. Capela de exaustão química;
17. Centrífuga refrigerada;
18. Estufa a 37°C;
19. Refrigerador;
20. Jaleco;
21. Luvas;
22. Álcool 70%;
23. Becker para descarte das ponteiras ou fenol descarte;
24. Ata para registro de resultados.

## Atividades

- Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura ambiente por 20 a 35 minutos;
- Homogeneizar todos os reagentes antes de realizar a prova;
- Diluir o antígeno para a prova de SAL 100 vezes, em solução salina fenicada (concentração final 0,045%);

- Diluir o antígeno para a prova de redução pelo 2ME 50 vezes em solução salina a 0,85% (concentração final 0,09%);
- Preparar uma solução de 2ME a 0,1 mol/L misturando 7,8 mL de 2 ME em 992,2 mL de solução salina a 0,85%, ou outros volumes nessa proporção;
- Para cada amostra, colocar em uma estante 2 conjuntos de 4 tubos de vidro. Um conjunto corresponde a quatro diluições do soro para a prova do SAL e o outro corresponde a prova de 2ME;
- Fazer diluições seriadas das amostras de soro a 1:200; 1:100; 1:50 e 1:25, distribuindo-se nesta ordem 10 µL, 20 µL, 40 µL e 80 µL de soro em cada tubo. Distribuí-las nos dois conjuntos de tubos;
- Colocar 1 ml de solução de 2ME, 0,1 mol/L diluído em solução salina nos quatro tubos para a prova 2ME;
- Deixar essas amostras em repouso por pelo menos 15 minutos em temperatura ambiente para o 2ME agir, lisando as IgM;
- Enquanto os tubos da prova 2ME estiverem em repouso, colocar 2 mL do antígeno diluído 1:100 em solução salina fenicada nos quatro tubos para a prova de SAL;
- Após 15 minutos, colocar 2 mL do antígeno diluído 1:50 em solução salina nos 4 tubos para a prova de 2ME. A concentração final do antígeno será 0,045% e a do 2 ME será de 0,05 mol/L;
- Misturar bem agitando a estante;
- Incubar a 37°C por 48 h;
- A leitura é realizada por meio de uma fonte de luz indireta com fundo escuro opaco.

#### **Cuidados especiais**

- Realizar a análise em capela de exaustão, pois o 2-ME é tóxico;
- Os antígenos devem ser conservados sob refrigeração e nunca congelados.

#### **Ações em caso de não conformidade**

Repetir o teste de acordo com os procedimentos descritos acima.

### **Observações**

A SAL é utilizada em associação com o teste de redução pelo 2ME para confirmar amostrar reagentes no teste de triagem. O teste de redução 2ME é uma amostra quantitativa seletiva que detecta somente a presença de IgG no soro, que é imunoglobulina indicativa para infecção crônica. Baseia-se no fato dos anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham radicais tiol. Essas subunidades não dão origem a complexos suficientemente grandes para provocar aglutinação. Desse modo soros com predomínio de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta.

### **Bibliografia utilizada**

Instituto Biológico – Secretaria de Agricultura/SP. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Antígeno prova lenta para diagnóstico indireto da brucelose bovina. Suspensão inativada de *Brucella abortus* amostra 119-3 diluída a 4,5% em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Responsável Técnico: Médico Veterinário Ricardo Spacagna Jordão, CRMV-SP nº14.743. Bula.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p. 2006.

